



Cristiana Catarina Dias Santos

Licenciada em Bioquímica

**Estudo dos genes *DICER1* e *C8orf48*
em formas familiares de bócio
multinodular e cancro da tiróide**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre
em Genética Molecular e Biomedicina

Orientadora: Doutora Branca Cavaco, Unidade de
Investigação em Patobiologia Molecular (UIPM), Instituto
Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, EPE
(IPOLFG)

Co-orientador: Doutor Valeriano Leite, Instituto Português
de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Paula Maria Theriaga Mendes
Bernardo Gonçalves

Arguente: Prof. Doutora Jacinta de Fátima Rosário Serpa



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2013



Cristiana Catarina Dias Santos

Licenciada em Bioquímica

**Estudo dos genes *DICER1* e *C8orf48* em
formas familiares de bócio multinodular
e cancro da tiróide**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre
em Genética Molecular e Biomedicina

Orientadora: Doutora Branca Cavaco, Unidade de
Investigação em Patobiologia Molecular (UIPM), Instituto
Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, EPE
(IPOLFG)

Co-orientador: Doutor Valeriano Leite, Instituto Português
de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Paula Maria Theriaga Mendes
Bernardo Gonçalves

Arguente: Prof. Doutora Jacinta de Fátima Rosário Serpa



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2013

Estudo dos genes *DICER1* e *C8orf48* em formas familiares de bócio multinodular e cancro da tiróide

Copyright Cristiana Catarina Dias Santos, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que tornaram este projecto concretiz6vel, e sem as quais n6o seria poss6vel chegar at6 aqui, em especial, 6 minha orientadora, Doutora Branca Cavaco, pela oportunidade de realizar investiga66o no grupo de Endocrinologia Molecular do IPO-Lisboa, pelos seus ensinamentos, disponibilidade e simpatia. Ao Doutor Valeriano Leite, pela sua disponibilidade e boa-disposi66o. Quero tamb6m agradecer ao meu coordenador de Mestrado, o Professor Doutor Jos6 Sampaio pela sua dedica66o.

Quero ainda agradecer aos meus colegas de grupo, nomeadamente, 6 Ana Lu6sa Silva por todo o apoio imprescind6vel prestado durante a realiza66o deste trabalho, 6 In6s Figueiredo por me ter ensinado as t6cnicas essenciais logo no in6cio deste projecto, ao Jaime P6ta pela sua disponibilidade, simpatia, e apoio prestado durante o trabalho com as c6lulas, 6 Margarida Moura pela sua ajuda indispens6vel e ensinamentos, e 6 Rita Domingues, pelo apoio ao longo deste trabalho. Gostaria tamb6m de agradecer aos restantes membros do UIPM, em especial ao Doutor H6lio Belo, pelo apoio prestado no RT-PCR quantitativo, e ao Doutor Bruno Cardoso pelo apoio e simpatia.

Um agradecimento muito especial a todas as fam6lias que se disponibilizaram para este estudo, pois sem elas este projecto n6o se teria realizado.

Agrade6o a todos os meus amigos, que tiveram sempre uma palavra amiga e me souberam transmitir confian6a, nos momentos em que andava mais insegura. 6 Catarina pela sua constante amizade e apoio ao longo de toda a vida. 6 N6dia, a minha “grande bioqu6mica”, por estar sempre l6, mesmo quando se encontrava em It6lia a fazer as suas experi6ncias. 6 C6tia pelos nossos caf6s sempre muito divertidos. 6 Bianca por ser sempre t6o animada e pelos momentos de partilha. E a todos os amigos que conheci na resid6ncia da FCT, por tornarem a resid6ncia um lugar sempre t6o maravilhoso, um especial obrigado 6 Joana e 6 Catarina Belo, por estarem sempre presentes e por me terem acompanhado neste projecto. Ao Elton, por estar sempre muito perto mesmo estando t6o longe, por ter sempre uma palavra de apoio e de compreens6o, e por ser t6o bom ouvinte dos meus desabafos, e a todos os outros amigos que contribuíram para que continuasse a acreditar na ci6ncia como projecto para o futuro.

Aos meus pais pelas palavras ternas, por todo o carinho infind6vel, pela confian6a que depositam em mim, por me apoiarem nas minhas decis6es, e por nunca me deixarem desistir da ci6ncia. Ao meu irm6o pela motiva66o e apoio.

RESUMO

As formas familiares de carcinomas não-medulares da tiróide (FNMTC) representam 5% das neoplasias que ocorrem na glândula tiroideia. Até à data, foram mapeados oito *loci* de susceptibilidade para o FNMTC, no entanto, apenas o gene de susceptibilidade *DICER1*, localizado no cromossoma 14q31, foi identificado. Este gene encontra-se também mutado em formas familiares de bócio multinodular (FMNG).

Este trabalho teve como objectivo investigar o papel do gene *DICER1* na etiologia de lesões tiroideias, em famílias com FMNG, FNMTC, e em famílias com casos de carcinomas não-medulares da tiróide e/ou de bócio multinodular. Nestas famílias, identificaram-se sete polimorfismos intrónicos no gene *DICER1*, cinco dos quais estavam localizados numa região de microssatélites. Em suma, os resultados deste estudo sugerem que não são frequentes as mutações nas regiões codificantes do gene *DICER1* em lesões benignas e carcinomas familiares da tiróide.

Neste projecto, pretendeu-se ainda estudar a nível funcional a variante c.65C>T (p.T22I) do gene *C8orf48* (localizado no *locus* 8p23.1-p22), identificada através da sequenciação global do exoma (WES), num doente de uma família Portuguesa com FNMTC. Para o estudo funcional da variante c.65C>T, construiu-se um plasmídeo pcDNA3NeoMyc que expressava o gene *C8orf48 wild type* e outro que expressava o gene *C8orf48* com a variante c.65C>T. Após a construção dos plasmídeos, procedeu-se à transfecção transiente de células de carcinoma papilar da tiróide humano (linha celular TPC-1) com os plasmídeos referidos anteriormente e com o plasmídeo sem o gene *C8orf48*, e realizaram-se ensaios de viabilidade celular. Nestes ensaios, não se observaram diferenças estatisticamente significativas na viabilidade das células transfectadas com os diferentes plasmídeos, possivelmente devido a uma reduzida eficiência de transfecção, que poderá ser ultrapassada pela utilização de células com expressão estável dos plasmídeos.

O presente projecto constituiu a primeira etapa na identificação e caracterização de alterações na sequência dos genes *DICER1* e *C8orf48*, respectivamente. Novos estudos moleculares e celulares serão necessários para esclarecer o papel destes genes na tumorigénese da tiróide.

Palavras-Chave: tiróide, *DICER1*, FNMTC, FMNG, *C8orf48*, plasmídeos.

ABSTRACT

The familial forms of nonmedullary thyroid carcinoma (FNMTc) represent 5% of neoplasms that occur in the thyroid gland. To date, eight FNMTc susceptibility *loci* have already been mapped. However, only the *DICER1* susceptibility gene, mapped at chromosome 14q31, has been identified in these *loci*. This gene is also mutated in familial forms of multinodular goiter (FMNG).

In this project, we aimed to investigate the role of the *DICER1* gene in the etiology of thyroid lesions in FMNG, FNMTc, and in families with cases of nonmedullary thyroid carcinoma and/or multinodular goiter. In these families, we identified seven intronic polymorphisms in the *DICER1* gene, five of which located in a microsatellite sequence. These data suggest that mutations in the *DICER1* coding region are uncommon in patients with familial benign lesions and carcinomas of the thyroid.

In this project, we also aimed to study the functional effect of the c.65C> T (p.T22I) variant from the *C8orf48* gene (mapped at chromosome 8p23.1-p22), which was identified by whole-exome sequencing (WES), in a patient from a Portuguese family with FNMTc. For the functional study of the c.65C> T variant, we held the construction of a pcDNA3NeoMyc plasmid expressing the wild type *C8orf48* gene, and another expressing the *C8orf48* gene with the c.65C> T variant. After the construction of the plasmids, we proceeded to the transient transfection of human papillary thyroid carcinoma cells (TPC-1 cell line) with the plasmids mentioned above, and with a plasmid without the *C8orf48* gene, and undertook cell viability assays. We did not observe significant differences in the viability of the cells transfected with the different plasmids, possibly due to low transfection efficiency, a technical limitation which may be overcome by the use of cells with stable expression of the plasmids.

The present project represented the first phase in the identification and characterization of sequence alterations, respectively in the *DICER1* and *C8orf48* genes. Novel molecular and cellular studies are necessary to clarify the role of these genes in thyroid tumorigenesis.

Keywords: thyroid, *DICER1*, FNMTc, FMNG, *C8orf48*, plasmids.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS e SÍMBOLOS	xv
I. INTRODUÇÃO	1
1. Tumorigénese	1
2. Anatomia e função da glândula tiroideia	7
3. Neoplasias da tiróide	8
3.1 Adenomas foliculares da tiróide (FTA)	9
3.2 Carcinomas Medulares da Tiróide (MTC)	10
3.3 Carcinomas Não-Medulares da Tiróide (NMTC)	10
3.3.1 Carcinomas Papilares (PTC)	11
3.3.2 Carcinomas Foliculares (FTC)	11
3.3.3 Carcinomas Pouco Diferenciados (PDTC)	12
3.3.4 Carcinomas Anaplásicos (ATC)	13
4. Hiperplasias da tiróide	15
5. Formas familiares de carcinomas não-medulares da tiróide (FNMTTC)	16
5.1 Características clínicas do FNMTTC	16
5.2 <i>Loci</i> de susceptibilidade para o FNMTTC	17
6. Genes candidatos para o FNMTTC	19
6.1 Gene <i>DICER1</i>	20
6.2 Gene <i>C8orf48</i>	23
7. Aplicação de novas tecnologias de sequenciação na identificação de genes de susceptibilidade para o FNMTTC	25
7.1 Sequenciação Global do Exoma	25
8. Objectivos	26
II. MATERIAIS E MÉTODOS	27
1. Amostras biológicas	27
2. Extracção de DNA	30
2.1 Extracção de DNA a partir de sangue periférico	30

2.2	Extracção de DNA a partir de saliva	30
3.	Extracção de RNA.....	31
3.1	Extracção de RNA a partir de células de carcinoma papilar da tiróide (TPC-1).....	31
4.	Quantificação espectrofotométrica do DNA e RNA	32
5.	Síntese de cDNA por transcrição reversa do RNA	33
6.	Amplificação do DNA por PCR.....	34
7.	Optimização das condições de PCR.....	35
8.	PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).....	36
9.	Electroforese dos produtos de PCR em gel de agarose	38
10.	Sequenciação automática	39
10.1	Purificação dos produtos de PCR.....	40
10.2	Reacções de sequenciação.....	41
10.3	Precipitação dos produtos de sequenciação.....	41
10.4	Electroforese capilar dos produtos de sequenciação	42
11.	Preparação dos plasmídeos pcDNA3Neomyc-C8ORF48 WT e pcDNA3Neomyc-C8ORF48 MUT	43
11.1	Preparação do plasmídeo pcDNA3NeoMyc	43
11.1.1	Transformação de bactérias quimicamente competentes	43
11.1.2	Extracção e purificação do DNA plasmídico em pequena escala (<i>minipreps</i>).....	44
11.1.3	Preparação do DNA plasmídico em larga escala (<i>maxipreps</i>)	44
11.2	Amplificação do insert <i>C8orf48</i>	45
11.3	Hidrólise do insert <i>C8orf48</i> e do plasmídeo pcDNA3NeoMyc	46
11.4	Preparação do plasmídeo pcDNA3NeoMyc-C8ORF48 WT (<i>Wild type</i>).....	46
11.5	Preparação do plasmídeo pcDNA3NeoMyc-C8ORF48 MUT (Mutante).....	47
11.6	Preparação do plasmídeo pcDNA3NeoMyc-C8ORF48 WT e do plasmídeo pcDNA3NeoMyc-C8ORF48 MUT em larga escala (<i>maxiprep</i>).....	49
12.	Cultura de células	49
12.1	Descongelamento de células	50
12.2	Propagação e expansão de células.....	50
12.3	Contagem de células.....	51
12.4	Criopreservação de células.....	51
13.	Transfecção de células TPC-1 com vectores derivados do pcDNA3NeoMyc	51
14.	Ensaio de viabilidade celular.....	52
15.	Análise estatística.....	53
III.	RESULTADOS	54

1. Estudo do gene <i>DICER1</i> em famílias com FNMTc, FMNG, NMTC e MNG e num caso isolado de MNG associado a tumor do ovário	54
1.1 Famílias seleccionadas para o estudo do gene <i>DICER1</i>	54
1.2 Identificação de variantes genéticas no gene <i>DICER1</i>	61
1.2.1 Polimorfismos intrónicos identificados no gene <i>DICER1</i>	63
1.2.2 Variantes intrónicas identificadas no gene <i>DICER1</i>	63
1.2.2.1 Variante c.4444+11delGT no gene <i>DICER1</i>	64
1.2.2.2 Variante c. 4444+11delGTGT no gene <i>DICER1</i>	64
1.2.2.3 Variante c.4444+11delGTGTGT no gene <i>DICER1</i>	64
1.2.2.4 Variante c.4444+11delGTGTGTGTGTGTGT no gene <i>DICER1</i>	64
1.2.2.5 Variante c.4444+11delGTGTGTGTGTGTGTGT no gene <i>DICER1</i>	64
2. Estudo de uma nova variante no gene <i>C8orf48</i> identificada na família 1 com FNMTc 65	
2.1 Estudo da co-segregação da variante p.T22I com polimorfismos do gene <i>C8orf48</i> na família 1	66
3. Estudo funcional da variante p.T22I do gene <i>C8orf48</i>	68
3.1 Preparação de construções derivadas do plasmídeo pcDNA3NeoMyc	68
3.2 Transfecções transientes de células TPC-1 com construções derivadas do plasmídeo pcDNA3NeoMyc	69
3.3 Ensaio de viabilidade celular com células TPC-1 transfectadas de forma transiente 70	
3.4 Quantificação por qRT-PCR do nível de expressão do gene <i>C8orf48</i> nas células TPC-1 transfectadas de forma transiente com construções derivadas do plasmídeo pcDNA3NeoMyc	71
3.5 Sequenciação do gene <i>C8orf48</i> dos diferentes cDNAs amplificados por qRT-PCR 72	
IV. DISCUSSÃO	73
• Estudo do gene <i>DICER1</i> em famílias com FNMTc, FMNG, NMTC e MNG e num caso isolado de MNG associado a tumor do ovário	73
• Estudo funcional da variante p.T22I do gene <i>C8orf48</i> identificada numa família com FNMTc (família 1)	76
Conclusões	80
V. BIBLIOGRAFIA	81
ANEXOS	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1 - Hipótese de <i>Two-hit</i> de Knudson.....	2
Figura I.2 - Esquema que apresenta seis capacidades adquiridas pelas células neoplásicas que possibilitam o crescimento e a disseminação dos tumores.....	4
Figura I.3 - Esquema que apresenta quatro capacidades adquiridas pelas células neoplásicas que possibilitam o crescimento e a disseminação dos tumores.....	6
Figura I.4 - Localização da glândula tiroideia.....	7
Figura I.5 - Esquema representativo dos diferentes tipos de lesões tiroideias	9
Figura I.6 - Modelo para a tumorigénese da tiróide	14
Figura I.7 - Representação esquemática da biossíntese dos miRNAs.....	21
Figura I.8 - Representação esquemática dos domínios da <i>DICER1</i> humana	21
Figura I.9 - Representação das mutações encontradas no gene <i>DICER1</i>	23
Figura I.10 - Representação esquemática da via de transdução de sinal Wnt	25
Figura II.1 - Esquema representativo de uma reacção de PCR	34
Figura II.2 - Esquema representativo do sistema <i>SYBR Green</i>	36
Figura II.3 - Esquema representativo da sequenciação automática.....	40
Figura II.4 - Representação do plasmídeo pcDNA3NeoMyc	43
Figura III.1 - Árvore genealógica da família 2 com FNMTC, que foi alvo de estudo do gene <i>DICER1</i>	54
Figura III.2 - Árvore genealógica da família 3 com FNMTC, que foi alvo de estudo do gene <i>DICER1</i>	55
Figura III.3 - Árvore genealógica da família 4 com FNMTC, que foi alvo de estudo do gene <i>DICER1</i>	55
Figura III.4 - Árvore genealógica da família 5 com FNMTC, que foi alvo de estudo do gene <i>DICER1</i>	55
Figura III.5 - Árvore genealógica da família 6 com FNMTC, que foi alvo de estudo do gene <i>DICER1</i>	56
Figura III.6 - Árvore genealógica da família 7 com FNMTC, que foi alvo de estudo do gene <i>DICER1</i>	56
Figura III.7 - Árvore genealógica da família 8 com FNMTC, que foi alvo de estudo do gene <i>DICER1</i>	56
Figura III.8 - Árvore genealógica da família 9 com FMNG, que foi alvo de estudo do gene <i>DICER1</i>	57
Figura III.9 - Árvore genealógica da família 10 com FMNG, que foi alvo de estudo do gene <i>DICER1</i>	57

Figura III.10 - Árvore genealógica da família 11 com FMNG, que foi alvo de estudo do gene <i>DICER1</i>	58
Figura III.11 - Árvore genealógica da família 12 com FMNG, que foi alvo de estudo do gene <i>DICER1</i>	58
Figura III.12 - Árvore genealógica da família 13 com NMTC/MNG, que foi alvo de estudo do gene <i>DICER1</i>	59
Figura III.13 - Árvore genealógica da família 14 com NMTC/MNG, que foi alvo de estudo do gene <i>DICER1</i>	59
Figura III.14 - Árvore genealógica da família 15 com NMTC/MNG, que foi alvo de estudo do gene <i>DICER1</i>	60
Figura III.15 - Árvore genealógica da família 16 com NMTC/MNG, que foi alvo de estudo do gene <i>DICER1</i>	60
Figura III.16 - Variantes identificadas no gene <i>DICER1</i>	65
Figura III.17 - Árvore genealógica da família 1, na qual foi identificada uma nova variante (c.65C>T) no gene <i>C8orf48</i>	66
Figura III.18 - Árvore genealógica da família 1.....	67
Figura III.19 - Electroforese em gel de agarose 1% (p/v) dos produtos da hidrólise, com as enzimas <i>EcoRI</i> e <i>BamHI</i>	68
Figura III.20 - Electroforese em gel de agarose de 1% (p/v) dos produtos de amplificação por PCR do DNA do plasmídeo com o <i>insert C8orf48</i>	69
Figura III.21 - Sequenciação do DNA plasmídico contendo o <i>insert C8orf48 wild type</i> e sequenciação do DNA plasmídico contendo o <i>insert C8orf48</i> com a variante c.65C>T....	69
Figura III.22 - Ensaio de viabilidade celular com as células TPC-1 transfectadas com os plasmídeos pcDNA3 MUT, pcDNA3 WT e pcDNA3 vazio.....	70
Figura III.23 - Níveis de expressão relativos do gene <i>C8orf48</i> nas células transfectadas com os plasmídeos pcDNA3 vazio, pcDNA3 MUT e pcDNA3 WT.....	71
Figura III.24 - Sequenciação do gene <i>C8orf48</i> em células TPC-1 transfectadas com os plasmídeos pcDNA3 WT (A), pcDNA3 MUT (B) e pcDNA3 vazio (C).....	72

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I.1 - <i>Loci</i> de susceptibilidade para o FNMTC identificados até à data	19
Tabela III.1 - Variantes intrónicas identificadas no gene <i>DICER1</i> nos probandos das famílias estudadas.	62
Tabela III.2 - Polimorfismos intrónicos identificados no gene <i>DICER1</i> em probandos das famílias estudadas.	63
Tabela III.3 - Novas variantes intrónicas identificadas no gene <i>DICER1</i> em probandos das famílias estudadas.	63
Tabela III.4 - Estudo da segregação das variantes do gene <i>C8orf48</i>	67
Tabela I - Sequências dos <i>primers</i> e condições de amplificação por PCR, utilizados no estudo do gene <i>DICER1</i>	87
Tabela II - Sequências dos <i>primers</i> e condições de amplificação por PCR, utilizados no estudo do gene <i>C8orf48</i>	88
Tabela III - Sequências dos <i>primers</i> e condições de amplificação por PCR, utilizados na amplificação do <i>insert C8orf48</i>	88
Tabela IV - Sequências dos <i>primers</i> e condições de amplificação por PCR, utilizados na mutagénesse dirigida do <i>insert C8orf48</i>	88
Tabela V - Caracterização clínica dos indivíduos das famílias com FNMTC utilizadas para o estudo do gene <i>DICER1</i>	89
Tabela VI - Caracterização clínica dos indivíduos das famílias com FMNG utilizadas para o estudo do gene <i>DICER1</i>	90
Tabela VII - Caracterização clínica dos indivíduos das famílias com NMTC e MNG utilizadas para o estudo do gene <i>DICER1</i>	91
Tabela VIII - Caracterização clínica da doente que apresentava MNG associado com tumor das células lípidas do ovário.	91

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS e S6MBOLOS

A	Res6duo de nucle6t6ido contendo como base a adenina
AKT1/2	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1/2</i>
ANOVA	An6lise de vari6ncia (<i>Analysis of Variance</i>)
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
ATC	Carcinoma anapl6sico da tir6ide (<i>Anaplastic Thyroid Carcinoma</i>)
BAX	<i>BCL2-Associated X protein</i>
BCL-2	<i>B-Cell Lymphoma 2</i>
BER	Repara66o por excis6o de bases (<i>Base Excision Repair</i>)
BIM	<i>Bcl-2 Interacting Protein</i>
bp	N6mero de pares de res6duos de nucle6t6idos (<i>base pairs</i>)
BRAF	<i>Murine sarcoma viral (v-raf) oncogene homolog B1</i>
C	Res6duo de nucle6t6ido contendo como base a citosina
C8orf48	<i>Chromosome 8 open reading frame 48</i>
CCND1	<i>Cyclin D1</i>
CDH1	<i>Cadherin 1, Type 1, E-Cadherin</i>
CDKN1B/2A	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1B/2A</i>
cDNA	DNA complementar (do mRNA) (<i>complementary DNA</i>)
CLDN1	<i>Claudin 1</i>
CO₂	Di6xido de carbono
cPTC	Carcinoma papilar da tir6ide cl6ssico (<i>classic Papillary Thyroid Carcinoma</i>)
Ct	Ciclo de <i>threshold</i> (<i>threshold cycle</i>)
CTNNB1	<i>Catenin Beta 1</i>
ddNTP	Didesoxinucle6t6idos (<i>dideoxynucleotide</i>)
DEPC	Dietilpirocarbonato (<i>diethylpyrocarbonate</i>)
DGCR8	<i>DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8</i>
DMSO	Dimetilsulf6xido (<i>Dimethyl sulfoxide</i>)
DNA	6cido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Trifosfato de desoxinucle6t6ido (<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>)
DO	Densidade 6ptica
DTT	Ditiotreitol (<i>Dithiothreitol</i>)
EDTA	6cido etilenodiamino tetra-ac6tico (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EMT	Transi666o epitel6io-mesenquimatosa (<i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i>)
FAP	Polipose adenomatosa familiar (<i>Familial Adenomatous Polyposis</i>)
FBS	Soro fetal bovino (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FMNG	Forma familiar de b6cio multinodular (<i>Familial Multinodular Goiter</i>)
FNMTc	Formas familiares de NMTC (<i>Familial Nonmedullary Thyroid Carcinoma</i>)
FOXE1	<i>Forkhead box E1</i>
fPTC/PRN	<i>locus do Carcinoma papilar da tir6ide e da neoplasia papilar renal (Papillary Thyroid Carcinoma and Papillary Renal Neoplasia locus)</i>
FTA	Adenoma folicular da tir6ide (<i>Follicular Thyroid Adenoma</i>)
FTC	Carcinoma folicular da tir6ide (<i>Follicular Thyroid Carcinoma</i>)
FTEN	Neoplasias do epitel6io folicular da tir6ide (<i>Familial Thyroid Epithelial Neoplasia</i>)

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍGLAS E SÍMBOLOS

fvPTC	Carcinoma papilar da tiróide de variante folicular (<i>follicular variant of Pappillary Thyroid Carcinoma</i>)
g	Grama
G	Resíduo de nucleótido contendo como base a guanina
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green fluorescent protein</i>)
GSK3	Glicogénio sintase cinase-3 (<i>Glycogen Synthase Kinase-3</i>)
h	Hora
IGF1/2	<i>Insulin-like Growth Factor 1/2</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LEF	<i>Lymphoid Enhancer-binding Factor</i>
LOH	Perda de heterozigotia (<i>Loss Of Heterozygosity</i>)
LRP 5/6	<i>Low-density Lipoprotein-Related Protein 5/6</i>
m-	Mili
M	Molar
MAPK	Cascata mitogénica activada por proteínas cinase (<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>)
MDFI	<i>MyoD Family Inhibitor</i>
MEN	Neoplasia endócrina múltipla (<i>Multiple Endocrine Neoplasia</i>)
MgCl₂	Cloreto de magnésio
miRNA	microRNA
MMR	<i>Mismatch Repair</i>
MNG	Bócio multinodular (<i>Multinodular Goiter</i>)
mRNA	RNA mensageiro
MTC	Carcinoma medular da tiróide (<i>Medullary Thyroid Carcinoma</i>)
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboxi-metoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
MUT	Forma mutada de um gene ou proteína (<i>mutant</i>)
MYC	<i>Avian Myelocytomatosis viral oncogene homolog (v-myc)</i>
n-	Nano-
NER	Reparação por excisão de nucleótidos (<i>Nucleotide Excision Repair</i>)
NGS	Sequenciação da próxima geração (<i>Next-Generation Sequencing</i>)
NIS	Co-transportador de sódio/iodeto (<i>Sodium Iodide Symporter</i>)
NKX2-1	<i>NKX homeobox 1</i>
NMTC	Carcinoma não-medular da tiróide (<i>Nonmedullary Thyroid Carcinoma</i>)
onc	Variante oncocítica
OPTI-MEM	Meio de cultura (<i>OPTI Modified Eagle's Minimum Essential Medium</i>)
p	Braço curto do cromossoma
PAX8	<i>Paired box gene 8</i>
PBS	Tampão fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reacção em cadeia catalisada pela enzima polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PDPK1	<i>3-Phosphoinositide Dependent Protein Kinase 1</i>
PDTC	Carcinoma pouco diferenciado da tiróide (<i>Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma</i>)
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase, Catalytic Subunit Alpha</i>
PIK3CB	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase, Catalytic Subunit Beta</i>

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍGLAS E SÍMBOLOS

PMS	Metosulfato de fenazina
PPARγ	<i>Peroxisome Proliferaton-Activated Receptor subtype γ</i>
PPB	Blastoma pleuropulmonar (<i>Pleuropulmonary Blastoma</i>)
PTC	Carcinoma papilar da tiróide (<i>Papillary Thyroid Carcinoma</i>)
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome TEN</i>
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
q	Braço longo do cromossoma
RAS	<i>Rat sarcoma vírus homolog</i>
RB	Retinoblastoma
RET	<i>REarranged during Transfection</i>
RISC	Complexo de Silenciamento RNA-Induzido (<i>RNA-induced Silencing Complex</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reacção em cadeia catalisada pela enzima polimerase após transcrição reversa (<i>Reverse Transcription-Polimerase Chaim Reaction</i>)
SLCT	Tumores de células <i>Sertoli-Leydig</i> do ovário (<i>Sertoli-Leydig Cell Tumors</i>)
S.O.C.	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
T	Resíduo de nucleótido contendo como base a timina
T3	Triiodotironina
T4	Tetraiodotironina
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borato-EDTA
TCO	Carcinoma da tiróide com células oxifílicas (<i>Thyroid Carcinoma with Cell Oxyphilia</i>)
TP53	<i>Tumour Protein 53</i>
TPC-1	Linha celular de Carcinoma Papilar da Tiróide Humano
TPO	Tiroperoxidase (<i>Thyropoxidase</i>)
TRBP	<i>TAR RNA Binding Protein</i>
TRH	Hormona libertadora de tirotrofina (<i>Thyrotropin Releasing Hormone</i>)
TRK	<i>Tropomyosin-Related Kinase</i>
TSH	Tirotropina ou hormona estimuladora da tiróide (<i>Thyroid-Stimulating Hormone</i>)
U	Unidade de actividade enzimática
UTR	Região não traduzida (<i>UnTranslated Region</i>)
UV	Ultravioleta
VEGF-A	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>
WES	Sequenciação global do exoma (<i>Whole-Exome Sequencing</i>)
Wnt	<i>WiNgless-Type MMTV integration site family</i>
WT	Forma não mutada de um gene ou proteína (<i>wild type</i>)
% (p/v)	Percentagem expressa em peso por volume
% (v/v)	Percentagem expressa em volume por volume
μ-	Micro

I. INTRODUÇÃO

1. Tumorigénese

A tumorigénese é um processo com várias etapas, em que a acumulação de alterações genéticas confere às células uma vantagem proliferativa (Spencer *et al.*, 2006). O estudo da tumorigénese em humanos e em modelos animais, demonstrou que um tumor se desenvolve através de um processo análogo ao da evolução Darwiniana, em que uma sucessão de alterações genéticas, cada uma conferindo um determinado tipo de vantagem no crescimento celular, conduz progressivamente à conversão de células normais em células cancerígenas (Hanahan e Weinberg, 2000).

Os tumores são originados devido a alterações em três tipos de genes diferentes: oncogenes, genes supressores de tumor e genes que são responsáveis pela reparação do DNA (Vogelstein e Kinzler, 2004). As mutações nestas três classes de genes podem ocorrer em células germinais resultando numa predisposição hereditária para o desenvolvimento de um tumor, ou em células somáticas, resultando em tumores esporádicos (Vogelstein e Kinzler, 2004; Croce, 2008). Sabe-se que, uma única alteração genética não é suficiente para o desenvolvimento de uma neoplasia, pois as células dos mamíferos possuem múltiplos mecanismos que as protegem contra os efeitos potencialmente letais das mutações em genes de susceptibilidade para o cancro. Desta forma, para o desenvolvimento tumoral é necessário um conjunto de alterações em oncogenes, em genes supressores de tumor e/ou em genes reparadores do DNA (Vogelstein e Kinzler, 2004). A primeira mutação somática ou germinal num oncogene ou num gene supressor de tumor pode conduzir ao início da expansão clonal num processo de desenvolvimento neoplásico (génese tumoral). As subsequentes mutações somáticas levam a etapas adicionais de expansão clonal, e à progressão do tumor (Vogelstein e Kinzler, 2004).

Os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor controlam o ciclo de vida da célula; os proto-oncogenes estimulam o crescimento celular, enquanto que os genes supressores de tumor inibem este crescimento (Weinberg, 1996).

Os proto-oncogenes, quando mutados podem transformar-se em oncogenes, conduzindo, a uma excessiva multiplicação celular e por fim à tumorigénese (Weinberg, 1996). O crescimento de uma célula torna-se desregulado quando, por exemplo, uma alteração num proto-oncogene estimula uma via, que recebe e processa sinais de estimulação do crescimento transmitidos pelas outras células do tecido, mantendo-a continuamente activa (Weinberg, 1996).

A activação de oncogenes pode resultar de translocações cromossómicas, rearranjos entre genes, amplificações de genes ou de mutações pontuais intragénicas (Vogelstein e Kinzler, 2004). As mutações que conferem um ganho-de-função, convertendo proto-oncogenes em

oncogenes, actuam de forma dominante, isto é, a mutação num dos alelos é suficiente para conferir à célula uma vantagem selectiva no crescimento (Vogelstein e Kinzler, 2004).

Em contraste, os genes supressores de tumor codificam proteínas que inibem a proliferação celular (Weinberg, 1996). Estes genes contribuem para o desenvolvimento do cancro quando são inactivados por mutações (Weinberg, 1996).

As mutações que levam à perda-de-função de genes supressores de tumor actuam de forma recessiva, uma vez que ambos os alelos do gene devem estar inactivos para promover o desenvolvimento do tumor (Lodish *et al.*, 2004). De acordo com a hipótese de *Two-hit* de Knudson, para a inactivação de um gene supressor de tumor em indivíduos que herdassem uma cópia do gene alterada (o primeiro *hit* presente nas células germinais) seria necessária apenas uma mutação somática na cópia funcional do gene (segundo *hit*) para desencadear a tumorigénese (Knudson, 1971). A inactivação da segunda cópia do gene pode ocorrer através de diferentes mecanismos: a) perda de material cromossómico (perda de heterozigotia; LOH- *loss of heterozygosity*) (Jones e Laird, 1999); b) hipermetilação de promotores dos genes supressores de tumor - a metilação de ilhas CpG localizadas em promotores de genes pode conduzir ao silenciamento transcripcional (Jones e Laird, 1999); c) ocorrência de mutações pontuais (Cavenee *et al.*, 1983) (Figura I.1). Em tumores esporádicos, ambos os *hits* que conduzem à inactivação dos genes supressores de tumor são o resultado de alterações somáticas (Knudson, 1971).

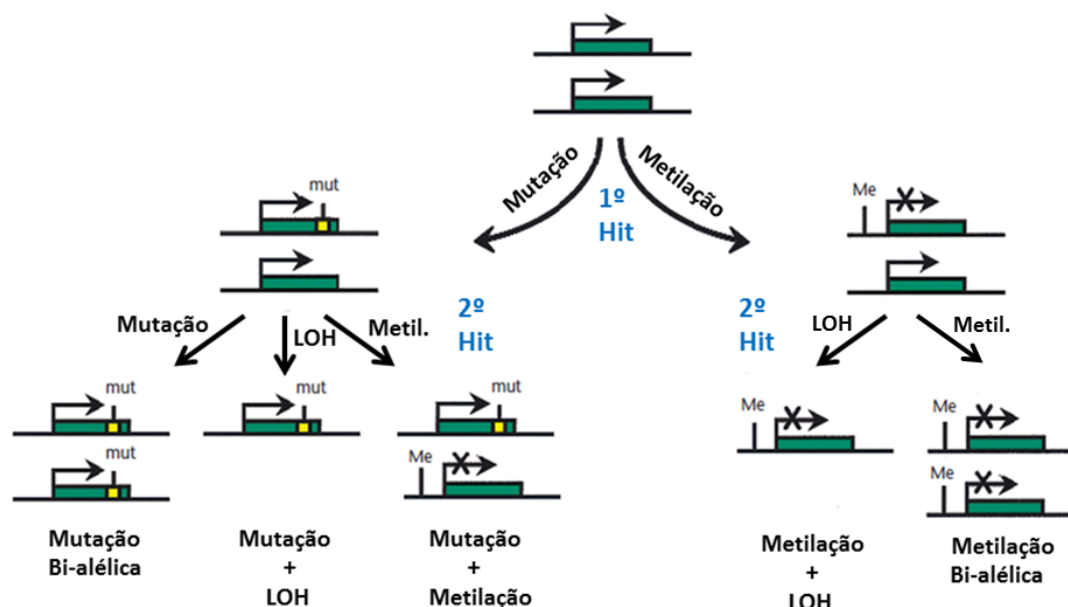


Figura I.1 - Hipótese de *Two-hit* de Knudson. Os dois alelos de um gene supressor de tumor estão indicados pelos rectângulos a verde. O primeiro *hit* de inactivação do gene encontra-se representado por uma mutação (seta da esquerda) ou pela metilação do DNA (seta da direita). O segundo *hit* encontra-se representado pela ocorrência de uma mutação pontual, pela LOH-perda de heterozigotia ou pela metilação (metil.) do DNA (adaptado de Jones e Laird, 1999).

Por último, uma terceira classe de genes de susceptibilidade para o cancro são os genes responsáveis pela reparação do DNA. Esta classe abrange os genes que realizam a reparação de pequenos erros na sequência que ocorrem durante a replicação do DNA ou que são induzidos pela exposição a agentes mutagénicos (Vogelstein e Kinzler, 2004). Neste grupo incluem-se os genes que são responsáveis pela reparação do tipo *Mismatch* (MMR-*Mismatch Repair*), pela reparação por excisão de bases (BER- *Base Excision Repair*), e pela reparação por excisão de nucleótidos (NER- *Nucleotide Excision Repair*) (Vogelstein e Kinzler, 2004). Entre estes genes responsáveis pela reparação do DNA encontram-se, por exemplo, os genes *MLH1* e *MSH2* (Vogelstein e Kinzler, 2004). Outros genes reparadores do DNA controlam os processos de recombinação mitótica e de segregação cromossómica (Vogelstein e Kinzler, 2004).

Os genes responsáveis pela reparação do DNA mantêm a ocorrência de alterações genéticas a uma taxa muito reduzida. Deste modo, quando estes são inactivados, as mutações noutros genes ocorrem a uma taxa mais elevada (Vogelstein e Kinzler, 2004). Tal como sucede com os genes supressores de tumor, ambos os alelos dos genes responsáveis pela reparação do DNA devem estar inactivos, para que se observe um efeito fisiopatológico (Vogelstein e Kinzler, 2004).

Weinberg e Hanahan (2000 e 2011) propuseram que os tumores partilham entre si dez características, isto é, dez capacidades distintas e complementares que possibilitam o crescimento de uma neoplasia e a sua disseminação através de metástases (Hanahan e Weinberg, 2011). Estas características são as seguintes (Figura I.2 e I.3) (Hanahan e Weinberg, 2000; Hanahan e Weinberg, 2011):

- **Sinalização proliferativa permanente** - as células tumorais possuem a capacidade de manter a sua proliferação de forma ilimitada. Os tecidos normais controlam a produção e a libertação de sinais promotores do crescimento, assegurando a homeostasia do número de células e a manutenção da arquitectura normal dos tecidos e a sua função. As células cancerígenas, através da desregulação destes sinais, podem adquirir a capacidade de manter a sinalização proliferativa de diferentes formas: produzindo factores de crescimento ou através do envio de sinais para estimular a proliferação das células normais, que se encontram no estroma associado ao tumor. A independência de factores de crescimento pode também ser conseguida através da activação constitutiva de componentes de vias de sinalização.

- **Evasão aos inibidores de crescimento** - as células tumorais têm a capacidade de contornar os programas que regulam negativamente a proliferação celular. Muitos destes programas dependem das acções de genes supressores de tumor. Por exemplo, observou-se que os genes supressores de tumor *RB* (retinoblastoma) e *TP53*, responsáveis por controlar a proliferação celular e a apoptose, se encontravam inactivos em vários tumores.

- **Resistência à morte celular** - a morte celular programada (apoptose) constitui uma barreira natural para o desenvolvimento do cancro. As células tumorais desenvolvem uma variedade de estratégias para limitar ou contornar a apoptose, sendo a mais comum a perda da função do gene supressor de tumor *TP53*. De forma alternativa, os tumores podem atingir os mesmos fins através do aumento da expressão de reguladores anti-apoptóticos (como o gene *BCL-2*), de sinais de sobrevivência (*IGF 1/2*), ou pela diminuição da expressão de factores pró-apoptóticos (genes *BAX*, *BIM*, *PUMA*).

- **Capacidade replicativa ilimitada** - esta capacidade das células tumorais contrasta com o comportamento das células normais, que sofrem um número limitado de divisões celulares. Esta limitação está associada a duas barreiras distintas para a proliferação: a senescência, uma entrada irreversível num estado não-proliferativo mas viável, e a crise celular, que envolve a morte da célula. Por outro lado, as células tumorais podem emergir de uma população em crise e exibir um potencial de replicação ilimitado - esta transição é designada de imortalização. A enzima telomerase, responsável pela adição de segmentos com sequências repetitivas às extremidades dos telómeros está praticamente ausente em células não-imortalizadas, no entanto, a sua expressão encontra-se aumentada nas células cancerígenas. A presença de actividade da telomerase está correlacionada com a resistência à indução tanto da senescência como da crise/apoptose.

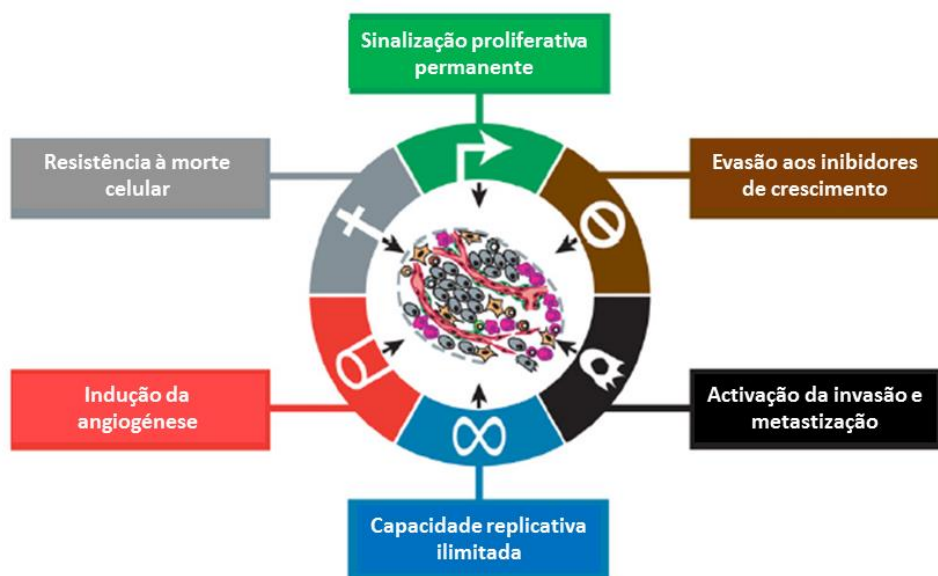


Figura 1.2 - Esquema que apresenta seis capacidades adquiridas pelas células neoplásicas que possibilitam o crescimento e a disseminação dos tumores (adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011).

- **Indução da angiogénese** - tal como nos tecidos normais, os tumores necessitam de oxigénio e nutrientes. Para satisfazer estas necessidades, nos tumores são formados novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes pelo processo de angiogénese. O gene *VEGF-A* codifica ligandos que estão envolvidos na formação de novos vasos sanguíneos durante o

desenvolvimento embrionário e pós-natal. Nas células tumorais, a expressão do gene *VEGF-A* pode ser estimulada tanto pela hipoxia como pela sinalização promovida por oncogenes.

- **Activação da invasão e metastização** - os tumores que têm origem em tecidos epiteliais podem progredir para graus mais avançados de malignidade, que se traduzem por invasão local e metastização. As células cancerígenas desenvolvem alterações na sua forma bem como na sua ligação às outras células e à matriz extracelular. Uma alteração molecular importante neste processo envolve a E-caderina, uma molécula chave na adesão entre células. É observado com frequência a diminuição da expressão da E-caderina em carcinomas humanos, e por vezes mutações no gene codificante (*CDH1*) que conduzem à sua inactivação. A expressão elevada de E-caderina antagoniza a invasão e a metastização dos tumores, enquanto que a redução da sua expressão potencia estes fenótipos.

No processo regulatório do desenvolvimento, designado de “transição epitélio-mesenquimatososa” (EMT, *Epithelial-Mesenchymal Transition*), as células epiteliais são transformadas em células mesenquimatosas. As células transformadas podem adquirir capacidades invasivas e propriedades para resistir à apoptose e para se disseminarem. O programa de EMT pode ser activado de forma transitória ou de forma contínua pelas células cancerígenas durante a invasão e metastização.

- **Instabilidade genómica e mutação** - a aquisição pelas células tumorais de algumas características referidas anteriormente depende, em grande parte, de uma sucessão de alterações nos seus genomas. A capacidade de determinados genes detectarem e corrigirem defeitos no DNA, assegura que a frequência de mutações espontâneas seja normalmente muito baixa durante cada geração celular. No processo de tumorigénese, a aquisição de mutações em diferentes genes ocorre com uma frequência mais elevada. Como já foi referido neste capítulo, para a progressão dos tumores contribuem diferentes defeitos em componentes específicos dos sistemas de reparação do DNA. Um dos membros mais relevantes destes sistemas é o gene supressor tumoral *TP53*, que em resposta aos danos no DNA estimula a paragem do ciclo celular ou a apoptose.

- **Indução de inflamação** - a inflamação pode contribuir para várias características dos tumores, pois fornece moléculas bioactivas para o microambiente tumoral, incluindo factores de crescimento que mantêm o sinal proliferativo, factores de sobrevivência que limitam a morte celular, enzimas modificadoras da matriz extracelular que facilitam a angiogénese, invasão e metastização, e sinais indutores que conduzem à activação da EMT.

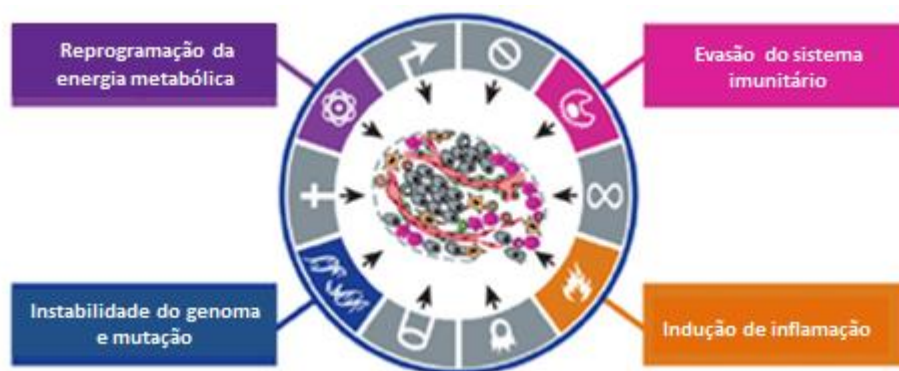


Figura I.3 - Esquema que apresenta quatro capacidades adquiridas pelas células neoplásicas que possibilitam o crescimento e a disseminação dos tumores (adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011).

Reprogramação da energia metabólica - a proliferação celular crônica, que é fundamental para o desenvolvimento tumoral, envolve não só o descontrole da proliferação dessas células, mas também os correspondentes ajustes do metabolismo energético para sustentar o crescimento e a divisão celular. Em condições aeróbicas, as células normais processam a glucose, primeiro para piruvato, via glicólise no citoplasma e depois para dióxido de carbono na mitocôndria; em condições anaeróbicas, a glicólise é favorecida e pouco piruvato é enviado para a mitocôndria. Otto Warburg observou uma característica invulgar no metabolismo energético das células tumorais: estas, mesmo na presença de oxigênio, podiam realizar a glicólise, que foi designada de “glicólise aeróbica”. As células neoplásicas necessitam não só de glucose, mas também de glutamina (Dang, 2010). A glutamina é importada pelas células e é utilizada em diferentes processos, incluindo a glutaminólise, que envolve a conversão de glutamina em glutamato e amônia, pela enzima glutaminase. O glutamato é, posteriormente, oxidado através do ciclo de Krebs para produzir adenosinatrifosfato (ATP) e fornecer carbono para a síntese de aminoácidos, nucleótidos e lípidos (Dang, 2010).

- **Evasão do sistema imunitário** - as células e os tecidos são constantemente monitorizados pelo sistema imunitário. Esta vigilância é responsável pelo reconhecimento e pela eliminação da vasta maioria das células cancerígenas. Indivíduos imunocomprometidos possuem um sistema imunitário com defeitos na monitorização de células neoplásicas, apresentando um aumento de determinados tipos de cancro, a maioria por indução viral.

2. Anatomia e função da glândula tiroideia

A glândula tiroideia localiza-se na região anterior à traqueia e é constituída por dois lobos ligados por um istmo (Muro-Cacho e K. Ku, 2000). A tiróide adulta varia em tamanho e aspecto, de acordo com o sexo, a sua actividade funcional, o seu estado hormonal e com a captação de iodo (Muro-Cacho e K. Ku, 2000). Os dois lobos da tiróide contêm entre 20 a 40 folículos (Muro-Cacho e K. Ku, 2000). Os folículos são estruturas de forma redonda ou oval, preenchidas com colóide (Muro-Cacho e K. Ku, 2000) (Figura I.4).

A glândula tiroideia possui dois tipos de células epiteliais, as células foliculares e as células parafoliculares ou células C (Muro-Cacho e K. Ku, 2000). As células foliculares constituem a maioria do epitélio e formam uma monocamada que reveste os folículos, sendo responsáveis pela captação de iodo e pela síntese de hormonas tiroideias (Muro-Cacho e K. Ku, 2000; Kondo *et al.*, 2006). As células parafoliculares são responsáveis pela produção de uma hormona reguladora do cálcio, designada de calcitonina (Kondo *et al.*, 2006).

As principais funções da tiróide são a síntese, o armazenamento e a secreção de hormonas tiroideias, a triiodotironina (T3) e a tiroxina (T4), sob o controlo do eixo hipotálamo-hipófise (Kondo *et al.*, 2006). A hormona TRH (*Thyrotropin Releasing Hormone*) secretada a partir do hipotálamo estimula a libertação da hormona TSH (*Thyroid Stimulating Hormone*) pela hipófise anterior (Kondo *et al.*, 2006). A TSH estimula a síntese e a secreção de hormonas tiroideias pelas células foliculares (Kondo *et al.*, 2006). Estas hormonas desempenham um papel importante no metabolismo, crescimento e na maturação de diferentes sistemas de órgãos (Spitzweg e Morris, 2002).

O transporte activo de iodo na tiróide é crucial para a biossíntese das hormonas tiroideias (Spitzweg e Morris, 2002). Este transporte é mediado por um transportador específico de iodo sódio-dependente (NIS- *Sodium Iodide Symporter*), que se localiza na membrana basolateral das células foliculares da tiróide (Spitzweg e Morris, 2002).

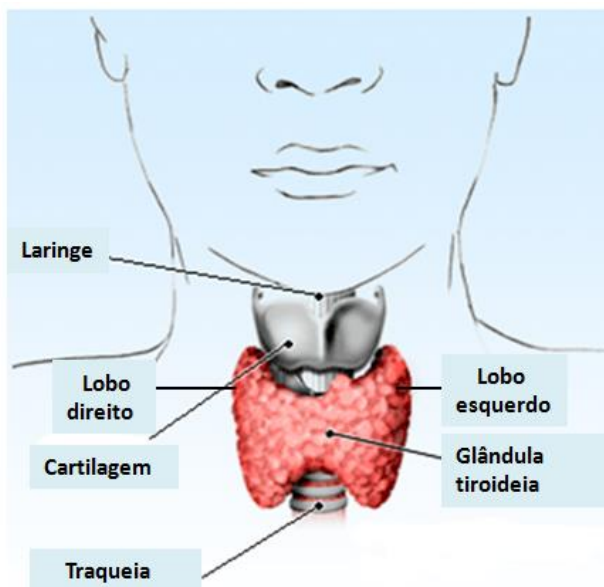


Figura I.4 - Localização da glândula tiroideia (adaptado de [http:// www.emedicinehealth.com/thyroid_problems/article_em.htm](http://www.emedicinehealth.com/thyroid_problems/article_em.htm)).

3. Neoplasias da tiróide

Os carcinomas da tiróide representam cerca de 1% de todas as neoplasias, com uma incidência anual de 212 000 casos em todo o mundo (Landa e Robledo, 2011). No entanto, este número tem vindo a aumentar, possivelmente devido ao avanço nas técnicas de diagnóstico e ao efeito de factores ambientais (Landa e Robledo, 2011).

Apesar da incidência mundial de cancro da tiróide ser relativamente baixa, esta é a neoplasia do sistema endócrino mais comum, afectando principalmente jovens e adultos de meia-idade, sendo rara em crianças (DeLellis *et al.*, 2004). Diferentes estudos demonstraram que o cancro da tiróide é duas a quatro vezes mais frequente em mulheres do que em homens. Esta observação sugere o envolvimento de genes de susceptibilidade relacionados com receptores hormonais na patogénese dos carcinomas da tiróide (DeLellis *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de carcinomas da tiróide é influenciado por factores hormonais, genéticos e ambientais, e pela interacção entre eles (DeLellis *et al.*, 2004). Os factores ambientais podem ser separados em efeitos genotóxicos e não-genotóxicos (DeLellis *et al.*, 2004). Devido à dependência da tiróide do iodo obtido a partir do ambiente, esta é vulnerável aos efeitos genotóxicos (isto é, efeitos que conduzem a danos no DNA) do iodo radioactivo e aos efeitos não-genotóxicos, resultantes da deficiência em iodo. A radiação também é um factor de risco para adenomas e carcinomas foliculares da tiróide (DeLellis *et al.*, 2004). Outros factores de risco incluem a tiroidite linfocítica e a história familiar de cancro da tiróide (Kondo *et al.*, 2006).

As neoplasias da tiróide dividem-se em dois grupos principais, dependendo do tipo de células que são afectadas pela transformação maligna (Landa e Mercedes, 2011). Os tumores da tiróide mais comuns têm origem a partir de células foliculares da tiróide e estes designam-se de carcinomas não-medulares (NMTC - *Nonmedullary Thyroid Carcinoma*) (Landa e Mercedes, 2011). Os NMTC dividem-se em tumores benignos e malignos (Muro-Cacho e K. Ku, 2000). Os tumores benignos são designados de adenomas foliculares e os tumores malignos são designados de carcinomas (Muro-Cacho e K. Ku, 2000). Os tumores malignos derivados de células foliculares incluem os carcinomas bem-diferenciados (WDTC - *Well Differentiated Thyroid Carcinoma*), entre os quais se encontram os carcinomas papilares (PTC - *Papillary Thyroid Carcinoma*) e foliculares da tiróide (FTC - *Follicular Thyroid Carcinoma*), que geralmente apresentam um bom prognóstico e um número de mortes associadas relativamente baixo. A maioria dos tumores bem-diferenciados da tiróide é indolente e pode ser eficazmente tratada por ressecção cirúrgica (Kondo *et al.*, 2006).

Os tumores malignos derivados de células foliculares incluem ainda os carcinomas pouco diferenciados da tiróide (PDTC - *Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma*) e os carcinomas indiferenciados ou anaplásicos da tiróide (ATC - *Anaplastic Thyroid Carcinoma*). Estes dois

últimos histotipos são menos frequentes, têm um comportamento mais agressivo e apresentam um pior prognóstico que os tumores bem-diferenciados. Os ATC constituem uma das formas mais letais de todos os tumores humanos, com sobrevivências inferiores a 1 ano na maioria dos casos, e para tais não existe, actualmente, uma forma de tratamento efectiva (Kondo *et al.*, 2006; Bonora *et al.*, 2010; Landa e Mercedes, 2011) (Figura I.5).

O segundo grupo de neoplasias da tiróide inclui os carcinomas medulares da tiróide (MTC- *Medullary Thyroid Carcinoma*) e representa uma minoria dos tumores que ocorrem nesta glândula (5 a 10%) (Landa e Mercedes, 2011) (Figura I.5). Estes carcinomas têm origem a partir das células parafoliculares da tiróide (Landa e Mercedes, 2011).

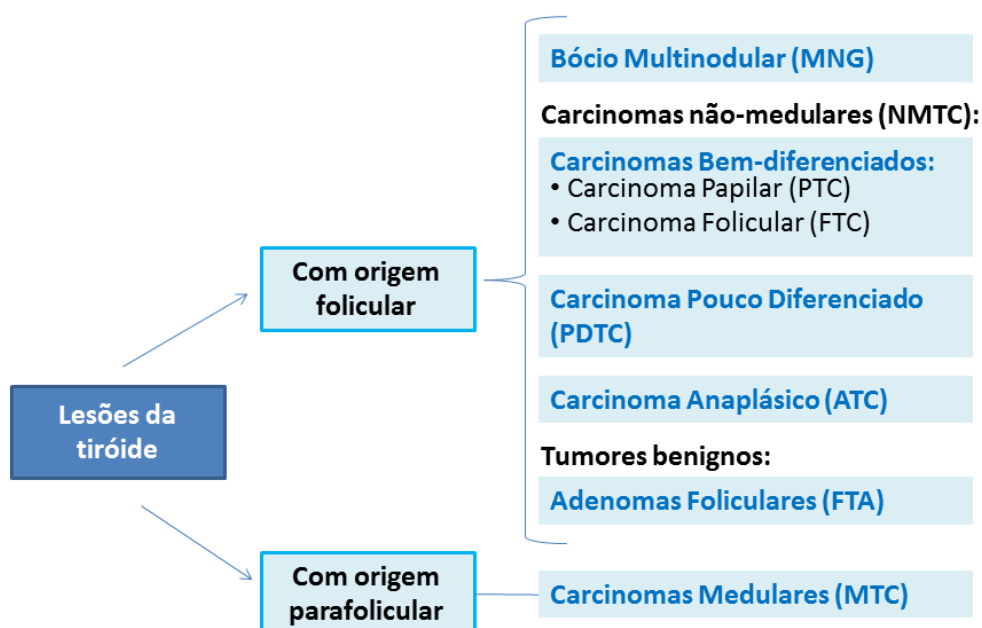


Figura I.5 - Esquema representativo dos diferentes tipos de lesões tiroideias (adaptado de Muro - Cacho e K. Ku, 2000).

3.1 Adenomas foliculares da tiróide (FTA)

O adenoma folicular da tiróide (FTA - *Follicular Thyroid Adenoma*) é um tumor benigno derivado do epitélio folicular da tiróide (DeLellis *et al.*, 2004). O FTA é em geral um nódulo solitário, redondo ou oval, delimitado por uma cápsula fina (DeLellis *et al.*, 2004). Alterações secundárias, tais como hemorragia e degeneração quística, podem estar presentes (DeLellis *et al.*, 2004). De forma ocasional, os adenomas foliculares podem surgir num *background* de hiperplasia nodular (DeLellis *et al.*, 2004). Os factores envolvidos no desenvolvimento de adenomas são partilhados com aqueles associados ao desenvolvimento de carcinomas foliculares (DeLellis *et al.*, 2004). Os adenomas podem ser induzidos por radiação e são comuns em regiões com deficiência de iodo. As mulheres são afectadas mais frequentemente do que os homens (DeLellis *et al.*, 2004).

A nível genético, foram identificados rearranjos *PAX8-PPAR γ* (*PAX8* - *Paired box 8*; *PPAR γ* - *Peroxisome Proliferaton-Activated Receptor subtype γ*) em 13% dos adenomas

foliculares (Marques *et al.*, 2002). Num outro estudo, Nikiforova e colaboradores identificaram mutações no gene *RAS* (*Rat sarcoma vírus homolog*) em 48% dos adenomas foliculares (Nikiforova *et al.*, 2003).

3.2 Carcinomas Medulares da Tiróide (MTC)

O carcinoma medular da tiróide (MTC) é um tumor maligno que tem origem a partir das células parafoliculares da tiróide (DeLellis *et al.*, 2004). Estes tumores são pouco comuns e representam 5 a 10 % de todas as neoplasias da tiróide (DeLellis *et al.*, 2004). Os MTC apresentam uma cor branco-acinzentada, a sua consistência é dura e encontram-se bem circunscritos, mas não são encapsulados. O seu tamanho pode variar entre menos de 1 cm (micro-carcinomas) até diferentes centímetros de diâmetro (DeLellis *et al.*, 2004). Os MTC tendem a metastizar precocemente, particularmente para gânglios linfáticos cervicais (DeLellis *et al.*, 2004).

Cerca de 25% dos casos de MTC são hereditários e estão associados à síndrome de neoplasias endócrinas múltiplas [(MEN (*Multiple Endocrine Neoplasia*) tipo 2A e 2B], ou podem surgir isoladamente (*Family Medullary Thyroid Carcinoma* - FMTC), apresentando em ambos os casos um modo de transmissão autossómico dominante (DeLellis *et al.*, 2004). A nível genético, mais de 95% dos doentes com MEN2A, MEN2B e FMTC possuem mutações germinais que resultam num ganho-de-função do proto-oncogene *RET* (*REarranged during Transfection*) (DeLellis, 2006).

Os casos de MTC esporádicos representam 75% de todas as neoplasias medulares da tiróide e a idade média de manifestação destas é de 50 anos (DeLellis *et al.*, 2004). A nível genético, mutações no gene *RET* foram também detectadas em 12-100% dos tumores de doentes com MTC esporádicos (Dvorakova *et al.*, 2008). Num outro estudo do nosso grupo, foram identificadas mutações no gene *RAS* em 68% dos casos esporádicos negativos para mutações no gene *RET*, e apenas 2,5% em casos esporádicos positivos para mutações no gene *RET*, sugerindo que a activação dos proto-oncogenes *RAS* e *RET* representam eventos genéticos alternativos para a tumorigénese de MTC esporádicos (Moura *et al.*, 2011).

3.3 Carcinomas Não-Medulares da Tiróide (NMTC)

Os carcinomas não-medulares da tiróide são derivados a partir das células foliculares e representam aproximadamente 90% dos tumores da tiróide (DeLellis, 2006).

3.3.1 Carcinomas Papilares (PTC)

Os carcinomas papilares da tiróide (PTC) representam aproximadamente 80% dos NMTC (DeLellis *et al.*, 2004). A maioria dos PTC manifesta-se em adultos entre os 20 e os 50 anos de idade, com uma razão de mulheres/homens afectados de 4:1 (DeLellis *et al.*, 2004). Estes tumores geralmente apresentam um excelente prognóstico (Bonora *et al.*, 2010).

A maioria dos PTC possui uma cor cinzento-esbranquiçada e apresenta limites irregulares (DeLellis *et al.*, 2004). O seu tamanho varia de menos de 1 centímetro (microPTC) até vários centímetros (DeLellis *et al.*, 2004). Os PTC são caracterizados por diferentes alterações do núcleo, que incluem, o alargamento e irregularidade, a forma oval, sulcos, pseudoinclusões e um aspecto “vazio” (DeLellis *et al.*, 2004; Bonora *et al.*, 2010).

Existem numerosas variantes de neoplasias papilares da tiróide (Bonora *et al.*, 2010). Estas podem ser multifocais, mas tipicamente apresentam um crescimento lento, e uma tendência para se disseminarem para os gânglios linfáticos (Bonora *et al.*, 2010).

Uma variedade de alterações genéticas, incluindo rearranjos e mutações pontuais está envolvida no desenvolvimento dos PTC (DeLellis, 2006). Os alvos destes eventos genéticos incluem os genes *RET* e *TRK* (*Tropomyosin-related Kinase*) (rearranjos) e os genes *BRAF* [*(Murine sarcoma viral (v-raf) oncogene homolog B1)*] e, com menor frequência, *RAS* (mutações pontuais) (DeLellis, 2006). Em geral, os rearranjos encontram-se ligados à exposição a radiação, enquanto a origem das mutações pontuais permanece ainda desconhecida (DeLellis, 2006). Uma característica comum às alterações nos genes *RET*, *TRK*, *BRAF* e *RAS* é o facto de estas ocorrerem ao longo da via de sinalização MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) que, por sua vez, está envolvida na sinalização de uma variedade de factores de crescimento e de receptores de superfície celular (DeLellis, 2006). Os rearranjos *RET/PTC1* são mais comuns em microPTC e em tumores papilares clássicos (cPTC) (DeLellis *et al.*, 2004). Nos cPTC, o gene *BRAF* encontra-se mutado em cerca de 60% dos casos (De Falco *et al.*, 2008). Nos PTC variante folicular (fvPTC) são detectados rearranjos *PAX8-PPAR γ* em cerca de 40% dos casos, mutações no gene *BRAF* em 10% dos casos, e mutações nos genes *N-RAS* ou *H-RAS* em 25% dos casos (Castro *et al.*, 2006).

3.3.2 Carcinomas Foliculares (FTC)

Os carcinomas foliculares da tiróide (FTC) representam aproximadamente 15% dos NMTC (Bonora *et al.*, 2010). Estas neoplasias são mais comuns em mulheres, sendo a razão de mulheres/homens afectados de 3-4:1, e tendem a manifestar-se por volta dos 50 anos de idade (DeLellis *et al.*, 2004). A incidência de FTC é maior em áreas com deficiência de iodo e em indivíduos que se encontram expostos a radiação (DeLellis *et al.*, 2004).

A maioria dos FTC é encapsulada e possui dimensões superiores a 1 cm de diâmetro (DeLellis *et al.*, 2004). Estes podem ser compostos por folículos ou por células foliculares

arranjadas em padrões foliculares, sólidos ou trabeculares (DeLellis, 2006). Os FTC raramente são multifocais e normalmente não metastizam para gânglios linfáticos regionais, mas tendem a disseminar-se através da corrente sanguínea para os pulmões e ossos (Bonora *et al.*, 2010).

Os FTC são classificados em dois grupos, com base na extensão da sua invasão (DeLellis, 2006). Os tumores com invasão transcapsular e/ou invasão vascular limitada são classificados como carcinomas de invasão mínima (DeLellis, 2006). Os tumores com evidências de invasão capsular e/ou vascular são classificados como FTC de invasão extensa (DeLellis, 2006). Os FTC com uma invasão capsular mínima têm um risco de recorrência ou de metastização mínimo (DeLellis, 2006). Os FTC com invasão extensa são amplamente invasivos e estão associados a morbilidade e mortalidade elevadas (DeLellis, 2006).

Uma outra variante de FTC são os tumores oncocíticos (oncFTC). Estes tumores, tal como os FTC convencionais, podem ser subdivididos em FTC oncocíticos de invasão mínima ou de invasão extensa (DeLellis, 2006).

A nível genético, são frequentemente encontradas nos FTC esporádicos, mutações activadoras dos genes *RAS*, rearranjos *PAX8-PPAR γ* e, com menor frequência, a activação da via do *PTEN/AKT* (devido a mutações activadoras dos genes *PIK3CA* ou mutações inactivadoras do gene *PTEN*) (Bonora *et al.*, 2010).

3.3.3 Carcinomas Pouco Diferenciados (PDTC)

Os carcinomas pouco diferenciados da tiróide (PDTC) são carcinomas raros, representando menos de 10% dos casos de NMTC (Bonora *et al.*, 2010). A idade média de manifestação destes tumores situa-se entre os 55 e os 63 anos e são mais comuns em mulheres (Nikiforov *et al.*, 2012). A maioria dos doentes morre nos primeiros três anos após o diagnóstico e poucos doentes sobrevivem mais de 5 anos (DeLellis *et al.*, 2004).

Os PDTC têm origem em células foliculares e são caracterizados pela perda parcial de diferenciação das células tiroideias (Nikiforov *et al.*, 2012). Estes tumores ocupam tanto a nível morfológico como a nível do comportamento, uma posição intermédia entre os carcinomas bem-diferenciados e os carcinomas indiferenciados da tiróide (Nikiforov *et al.*, 2012). Alguns PDTC desenvolvem-se a partir de tumores da tiróide bem-diferenciados (PTC ou FTC) pré-existent, enquanto outros se desenvolvem *de novo* (Nikiforov *et al.*, 2012).

A maioria dos PDTC apresenta-se como massas sólidas, cinzento-esbranquiçadas e possui dimensões superiores a 3 centímetros de diâmetro (DeLellis *et al.*, 2004). Estes tumores podem manifestar um padrão de crescimento insular, trabecular ou sólido, e são caracterizados por uma actividade mitótica significativa, invasão capsular e vascular e necrose tumoral (DeLellis, 2006). Os PDTC frequentemente disseminam-se para gânglios linfáticos locais e metastizam para o fígado e ossos (DeLellis *et al.*, 2004).

A nível genético, as mutações somáticas que ocorrem nos PDTC podem ser divididas em dois grupos: (1) mutações que também ocorrem em tumores bem-diferenciados, iniciando a tumorigénese e predispondo os tumores para eventos moleculares subsequentes que conduzem à sua desdiferenciação. Este grupo inclui mutações nos genes *BRAF* e *RAS* (Nikiforov *et al.*, 2012). As mutações no gene *RAS* ocorrem em cerca de 18% dos PDTC (Pita *et al.*, 2013). (2) O segundo grupo engloba as mutações que estão presentes apenas em PDTC e são eventos tardios, que conduzem directamente ao processo de desdiferenciação. Este grupo inclui mutações nos genes *TP53* e *CTNNB1* (Nikiforov *et al.*, 2012). Num estudo recente realizado no nosso grupo, foram identificadas mutações no gene *TP53* em 27% dos PDTC, e mutações no gene *CTNNB1* em apenas 5% dos casos de PDTC (Pita *et al.*, 2013).

3.3.4 Carcinomas Anaplásicos (ATC)

Os carcinomas anaplásicos da tiróide (ATC) são definidos como neoplasias constituídas total ou parcialmente por células indiferenciadas (DeLellis, 2006).

Os ATC são as neoplasias mais agressivas da tiróide (Patel e Shaha, 2006). Estes tumores representam menos de 5% de todas as neoplasias da tiróide, no entanto, mais de metade das mortes por carcinomas da tiróide nos EUA resultam de ATC (DeLellis *et al.*, 2004). A taxa de mortalidade destas neoplasias é superior a 90%, com uma média de sobrevivência de 6 meses após o diagnóstico (DeLellis *et al.*, 2004). Actualmente, não existe uma forma de tratamento eficaz para os ATC (Kondo *et al.*, 2006).

Os ATC ocorrem principalmente em idosos (DeLellis *et al.*, 2004). Apenas 25% dos doentes têm uma idade inferior a 60 anos aquando do diagnóstico (DeLellis *et al.*, 2004). As mulheres são afectadas mais frequentemente do que os homens, com uma razão de mulheres/homens de 1,5:1 (DeLellis *et al.*, 2004).

A maioria dos doentes com ATC apresenta uma massa cervical, que se encontra em rápida expansão. A dimensão média da massa tumoral é de 8 centímetros, mas pode variar entre 3 e 20 centímetros (Patel e Shaha, 2006). A metastização local para gânglios é observada em 40% dos doentes com ATC (Patel e Shaha, 2006). Mais de 70% destes doentes apresentam invasão directa dos tecidos envolventes, incluindo a traqueia, o esófago e a laringe (Patel e Shaha, 2006). As metástases sistémicas ocorrem em cerca de 75% dos doentes, sendo os pulmões os locais alvo mais comuns, no entanto também se observam metástases nos ossos e no cérebro (Patel e Shaha, 2006).

A maioria dos ATC apresenta características histológicas de um carcinoma pré-existente, bem-diferenciado (folicular ou papilar) ou pouco-diferenciado (DeLellis *et al.*, 2004), no entanto, tem sido sugerido que alguns ATC surgem *de novo* (DeLellis *et al.*, 2004; Patel e Shaha, 2006).

Os ATC são tumores não encapsulados, apresentam uma cor de bronze, e exibem áreas de necrose, hemorragia e invasão vascular (DeLellis *et al.*, 2004; Patel e Shaha, 2006). A nível microscópico, estes tumores são caracterizados pela presença de células escamosas, epitelioides, fusiformes ou de células gigantes, e frequentemente ocorrem misturas destes tipos de células nos tumores individuais (DeLellis, 2006). As células anaplásicas, tipicamente, não apresentam receptores de tirotrófina, não transportam iodo, e não produzem tiroglobulina (Patel e Shaha, 2006).

O modelo clássico para a tumorigénese da tiróide (Figura I.6), considera que os carcinomas da tiróide são o resultado da acumulação de alterações genéticas que conduzem à progressão tumoral, através de um processo de desdiferenciação (Sastre-Perona e Santisteban, 2012). Neste modelo, observa-se que após o ganho de mutações em diferentes oncogenes e em genes supressores de tumor, os folículos diferenciados da tiróide podem dar origem a carcinomas bem-diferenciados (papilares ou foliculares), pouco-diferenciados e anaplásicos (Sastre-Perona e Santisteban, 2012).

Nos ATC, observam-se alterações em componentes envolvidos no controlo do ciclo celular, tais como a sobre-expressão da *ciclina D1*, a diminuição da expressão do gene *CDKN1B* e a inativação dos genes *PTEN* e *CDKN2A* (DeLellis *et al.*, 2004). Mutações nos genes *BRAF* e *RAS* parecem conferir uma predisposição para o desenvolvimento de PDTC e de ATC; enquanto que mutações no gene da β -catenina (*CTNNB1*) e no gene *TP53* têm sido implicadas na progressão destes tumores (DeLellis, 2006; Sastre-Perona e Santisteban, 2012). Outros estudos demonstraram que o ganho do número de cópias de determinados genes, incluindo o *PIK3CA*, *PIK3CB*, *PDPK1*, *AKT1* e o *AKT2*, são mais prevalentes em ATC do que em PDTC, sugerindo que estas alterações genéticas são importantes para a progressão e agressividade do cancro da tiróide (Xing, 2013). Em ATC, o ganho do número de cópias nos genes referidos, pode ocorrer através de amplificações genéticas, instabilidade cromossómica e/ou aneuploidia (Xing, 2013).

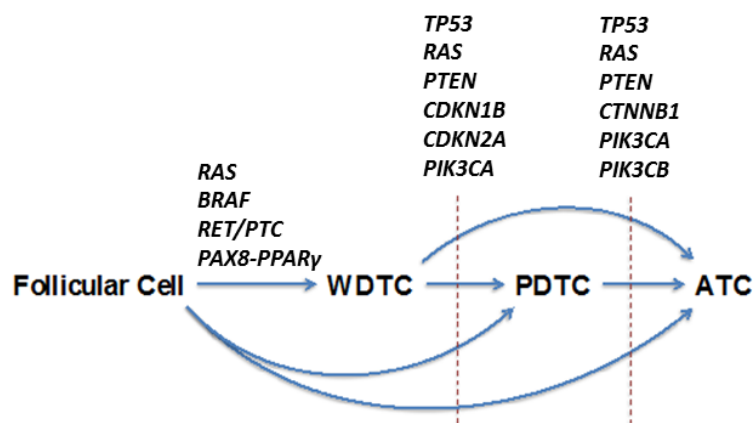


Figura I.6 - Modelo para a tumorigénese da tiróide (adaptado de Pita *et al.*, 2013). WDTC - tumores bem-diferenciados da tiróide; PDTC - tumores pouco diferenciados da tiróide e ATC - tumores anaplásicos da tiróide.

4. Hiperplasias da tiróide

A hiperplasia da tiróide ou bócio refere-se a um aumento do volume da glândula tiroideia, associado com anomalias funcionais, que não resultam de processos inflamatórios ou de neoplasia (Perez-Montiel e Suster, 2008).

A hiperplasia da tiróide é uma condição benigna que frequentemente se desenvolve como uma resposta fisiológica do epitélio folicular a alterações hormonais, que resultam em distúrbios no mecanismo *feedback* de libertação da hormona tirotrofina (TRH) e da hormona estimuladora da tiróide (TSH) (Perez-Montiel e Suster, 2008).

O bócio pode ser classificado segundo a morfologia que apresenta, como difuso, se existir um crescimento uniforme da glândula tiroideia, ou nodular, se a glândula tiroideia apresentar um ou mais nódulos (Sánchez *et al.*, 2010). O bócio nodular pode ser dividido em dois grupos: uninodular e multinodular (Krohn *et al.*, 2005). No caso do bócio multinodular, (MNG- *Multinodular Goiter*) a glândula tiroideia apresenta múltiplos nódulos. Existem duas formas de bócio multinodular: o bócio multinodular não-tóxico e o bócio multinodular tóxico (Krohn *et al.*, 2005). Os doentes com bócio multinodular não-tóxico apresentam níveis normais da hormona TSH e das hormonas da tiróide livres, enquanto que os doentes com bócio multinodular tóxico apresentam níveis superiores ao normal das hormonas da tiróide livres, não necessitando da estimulação da hormona TSH (encontrando-se esta suprimida) (Krohn *et al.*, 2005).

O bócio é mais prevalente em áreas com deficiência em iodo (Krohn *et al.*, 2005). Outros factores de risco para esta doença incluem o tabaco, o stresse, certas drogas, infecções e a exposição a radiação (Krohn *et al.*, 2005; Hegedus, 2003). O bócio é mais frequente em mulheres (de 5- a 15- vezes) do que em homens, mas as razões para esta diferença permanecem por esclarecer (Krohn *et al.*, 2005). Poderá dever-se a uma susceptibilidade genética para a doença tiroideia e/ou a um efeito directo das hormonas esteróides (Krohn *et al.*, 2005).

As hiperplasias da tiróide são frequentemente assintomáticas, no entanto, em muitos casos a remoção cirúrgica da glândula tiroideia é realizada para tratar sintomas locais ou por suspeita de malignidade (Perez-Montiel e Suster, 2008).

No que diz respeito às formas familiares de bócio multinodular (FMNG - *Familial Multinodular Goiter*), foram identificados recentemente diferentes *loci* de susceptibilidade para esta doença. O primeiro *locus* de susceptibilidade a ser identificado foi o *MNG1* (*Multinodular Goiter 1*), localizado no cromossoma 14q31. Este foi identificado numa família Canadiana, que possuía 18 indivíduos com MNG (este é também um *locus* de susceptibilidade para o FNMTTC) (Bignell *et al.*, 1997). Posteriormente Capon e colaboradores identificaram o *locus* de susceptibilidade *MNG2*, localizado no cromossoma Xp22 (Capon *et al.*, 2000). Este *locus* foi

detectado numa família Italiana com 3 gerações, na qual 10 mulheres e 2 homens apresentavam MNG (*Capon et al.*, 2000).

Num outro estudo realizado por Takahashi e colaboradores foram estudadas 2 famílias Japonesas não-relacionadas constituídas por várias gerações com MNG, eutiroidismo e elevados níveis de TSH no sangue (Takahashi *et al.*, 2001). As análises de *linkage* das 2 famílias incluíram 10 membros de cada família e conduziram à identificação de um único *locus* no cromossoma 3q26.1-1q26.3, designado de *MNG3* (Takahashi *et al.*, 2001).

Em 2004, Bayer e colaboradores realizaram análises de *linkage* globais do genoma, para detectar novos *loci* de susceptibilidade para o MNG, utilizando 450 marcadores de microssatélites em 18 famílias Dinamarquesas, Alemãs e Eslovacas (Bayer *et al.*, 2004). Neste estudo, os investigadores identificaram quatro novos *loci* candidatos para o FMNG nos cromossomas 2q, 3p, 7q e 8p (Bayer *et al.*, 2004).

5. Formas familiares de carcinomas não-medulares da tiróide (FNMTTC)

5.1 Características clínicas do FNMTTC

Aproximadamente 5% dos carcinomas não-medulares da tiróide (NMTC) ocorrem num *background* de predisposição familiar, designando-se de formas familiares de carcinomas não-medulares da tiróide (FNMTTC, *Familial Nonmedullary Thyroid Carcinoma*) (Malchoff e Malchoff, 2006). As evidências para a existência de FNMTTC provêm de investigações epidemiológicas, de estudos de grandes famílias com NMTC e de estudos genéticos de *linkage* (Malchoff e Malchoff, 2006).

Com base em características clínicas, o FNMTTC pode ser dividido em dois grupos (Malchoff e Malchoff, 2006). O primeiro inclui as síndromes familiares associadas com NMTC caracterizadas por uma predominância de tumores não-tiroideus (Malchoff e Malchoff, 2006; Bonora *et al.*, 2010). Neste grupo incluem-se a síndrome de Cowden, a síndrome de Gardner (polipose adenomatosa familiar, FAP), o complexo de Carney e a síndrome de Werner (Bonora *et al.*, 2010). O segundo grupo inclui as síndromes familiares com predominância de NMTC (Malchoff e Malchoff, 2006).

A análise de diferentes famílias e de estudos genéticos sugere que o padrão de transmissão do FNMTTC é autossómico dominante, a sua penetrância é incompleta e aumenta com a idade (Malchoff e Malchoff, 2006). Tal como no PTC esporádico, as mulheres são afectadas por FNMTTC cerca de 2 a 3 vezes mais do que os homens (Malchoff e Malchoff, 2006). A manifestação do FNMTTC pode ocorrer em idades mais precoces do que o NMTC esporádico, no entanto, um estudo realizado no Japão mostrou que a idade média de aparecimento tanto do NMTC esporádico como do FNMTTC é de aproximadamente 50 anos (Malchoff e Malchoff,

2006). A neoplasia mais frequente em doentes com FNMTTC é o PTC. Ocasionalmente, estes doentes apresentam FTC (Malchoff e Malchoff, 2006).

Os membros das famílias com FNMTTC, para além de NMTC, podem apresentar ainda lesões da tiróide benignas, incluindo adenomas foliculares, bócio multinodular e difuso e tiroidite auto-imune (Bonora *et al.*, 2010).

Alguns estudos sugerem que, comparativamente com os tumores esporádicos, os doentes com NMTC familiar podem apresentar tumores mais agressivos, em idades mais precoces, com taxas mais elevadas de extensão extra-tiroideia e metástases ganglionares, multifocalidade mais frequente, elevada recorrência, e um pior prognóstico (Bonora *et al.*, 2010).

Um trabalho recente de Capezzone *et al.* comparou as características de doentes com NMTC esporádico e de doentes com NMTC familiar e observou que os doentes com FNMTTC com parentesco progenitor-filho exibiam um fenómeno de “antecipação”, ou seja, uma idade mais precoce de manifestação da doença e uma gravidade aumentada nas gerações sucessivas (Bonora *et al.*, 2010; Capezzone *et al.*, 2008). No entanto, os estudos realizados pelo nosso grupo (manuscrito em preparação) e por outros autores (Loh, 1997; Moses *et al.*, 2011) não confirmam uma maior agressividade para os tumores de doentes com FNMTTC.

5.2 *Loci* de susceptibilidade para o FNMTTC

Para identificar os genes responsáveis pela predisposição para o cancro da tiróide familiar, diferentes grupos realizaram análises de *linkage* do genoma humano, usando marcadores de microssatélites uniformemente distribuídos pelo genoma, em famílias informativas, que apresentavam múltiplos membros afectados (Bonora *et al.*, 2010). Até à data, foram identificados oito *loci* diferentes de predisposição genética para o NMTC familiar: 1p13.2-1q22; 1q21; 2q21; 6q22; 8p23.1-p22; 8q24; 14q31; 19p13.2 (Malchoff *et al.*, 2000; Suh *et al.*, 2009; McKay *et al.*, 2001; Cavaco *et al.*, 2008b; He *et al.*, 2009; Bignell *et al.*, 1997; Canzian *et al.*, 1998; Landa e Robledo, 2011).

O primeiro *locus* a ser implicado no PTC familiar foi o *MNG1* (*Multinodular Goiter 1*), tal como já foi referido, este localiza-se na região cromossómica 14q31 e foi identificado por Bignell *et al.* numa família Canadiana, com 18 membros afectados com bócio multinodular (MNG), dos quais dois apresentavam também PTC (Bignell *et al.*, 1997; Bonora *et al.*, 2010). Este *locus* foi confirmado em outras famílias com MNG, no entanto, não foram encontradas evidências de *linkage* em famílias adicionais que apresentavam FNMTTC, sugerindo que apenas uma pequena percentagem de FNMTTC pode ser atribuída ao gene localizado neste *locus* (Bignell *et al.*, 1997; Bonora *et al.*, 2010).

Em 1998, um outro *locus* de susceptibilidade para o FNMTTC, designado *TCO* (*Thyroid Carcinoma With Cell Oxyphilia*), foi mapeado no cromossoma 19p13.2 por Canzian *et al.* (Bonora *et al.*, 2010). O estudo que conduziu à sua identificação analisou uma grande família

francesa com seis doentes afectados com MNG e três com PTC (Bonora *et al.*, 2010). Uma revisão histológica indicou que todos os casos examinados apresentavam características oncocíticas. Os tumores oncocíticos, também conhecidos como tumores oxifílicos, e na glândula tiroideia como tumores de células Hürthle, são constituídos por células repletas de mitocôndrias (Bonora *et al.*, 2010).

Em 2000, o *locus PRN1* ou *fPTC/PRN* (*locus* do carcinoma papilar da tiróide e da neoplasia papilar renal), foi identificado por Malchoff *et al.*, na região cromossómica 1p13.2-1q22 numa família Norte-Americana, com cinco membros afectados por PTC, um com cancro do cólon e dois com carcinoma papilar renal (Bonora *et al.*, 2010).

Um outro *locus* de susceptibilidade para o NMTC familiar (FNMTC1- *Familial Nonmedullary Thyroid Carcinoma Type 1*) foi identificado na região cromossómica 2q21 (Bonora *et al.*, 2010) através de estudos de *linkage* numa grande família da Tasmânia, que apresentava elevada frequência de PTC (Malchoff e Malchoff, 2006; Bonora *et al.*, 2010).

Em 2008, o nosso grupo realizou o estudo de uma grande família Portuguesa, que apresentava onze membros afectados com lesões benignas da tiróide, tais como bócios nodulares e adenomas foliculares, e cinco doentes afectados com cancro da tiróide (Cavaco *et al.*, 2008b). Através da análise de *linkage* global do genoma da referida família, foi identificado um novo *locus* de predisposição para o FNMTC na região cromossómica 8p23.1-p22, sendo este *locus* designado de *FTEN* (Cavaco *et al.*, 2008b).

Em 2009, num estudo efectuado por Suh *et al.*, através da análise de *linkage* realizada em 38 famílias com FNMTC, foram identificados dois *loci* diferentes de susceptibilidade para o FNMTC, localizados nas regiões cromossómicas 6q22 e 1q21 (Suh *et al.*, 2009).

Recentemente, He *et al.* identificaram na região cromossómica 8q24 um *locus* de susceptibilidade para o PTC (He *et al.*, 2009). Este *locus* foi identificado numa grande família com PTC e melanoma (He *et al.*, 2009).

Na tabela I.1 encontram-se sumarizados os *loci* de susceptibilidade para o FNMTC conhecidos até à data, a sua localização cromossómica, e os aspectos clínicos das famílias em que foram identificados.

Tabela I.I - *Loci* de susceptibilidade para o FNMTC identificados até à data (adaptado de Malchoff e Malchoff, 2006).

<i>Loci</i> de susceptibilidade	Localização cromossómica	Patologias	Referências
<i>MNG1</i>	14q31	MNG, PTC	Bignell <i>et al.</i> , 1997
<i>TCO</i>	19p13.2	Neoplasias da tiróide oxífilicas benignas e malignas	Canzian <i>et al.</i> , 1998
<i>PRN1</i> ou <i>fPTC/PRN</i>	1p13.2-1q22	PTC, MNG e carcinoma papilar renal	Malchoff <i>et al.</i> , 2000
<i>FNMTC1</i>	2q21	PTC e MNG	McKay <i>et al.</i> , 2001
<i>PTEN</i>	8p23.1-p22	MNG, FTA, cPTC e fvPTC	Cavaco <i>et al.</i> , 2008b
	1q21	FNMTC	Suh <i>et al.</i> , 2009
	6q22	FNMTC	Suh <i>et al.</i> , 2009
	8q24	PTC e melanoma	He <i>et al.</i> , 2009

Até à data, apenas foi identificado um gene de susceptibilidade para o FNMTC nos *loci* acima referidos, o gene *DICER1*, que se localiza no *locus MNG1* (Frio *et al.*, 2011). No entanto, o estudo de famílias com FNMTC indicou que somente uma pequena proporção de NMTC familiar pode ser atribuída ao *locus MNG1* (Bignell *et al.*, 1997).

O envolvimento de diferentes regiões cromossómicas sugere a existência de heterogeneidade genética para o FNMTC, no entanto, a base molecular desta doença é ainda desconhecida (Cavaco *et al.* 2008b; Pereira *et al.*, 2013).

6. Genes candidatos para o FNMTC

Têm sido propostos diversos genes candidatos para o FNMTC, nomeadamente: o gene *PTEN*, que é responsável pela doença de Cowden, o gene *MET*, que predispõe para o carcinoma papilar renal, o proto-oncogene *RET*, que se encontra envolvido na manifestação de MEN2A e B e MTC familiar isolado, e o gene *APC*, responsável pela polipose do cólon adenomatosa familiar (Malchoff *et al.*, 2000). Contudo, estudos de *linkage* e/ou de mutações excluíram o envolvimento destes genes na susceptibilidade para o FNMTC (Malchoff *et al.*, 2000). Foram ainda excluídos genes envolvidos em NMTC esporádico, *e.g.* *RAS* e *BRAF*.

Recentemente, num estudo realizado no nosso grupo, o gene *FOXE1*, que codifica o factor de transcrição FOXE1, (crucial para a morfogénese da tiróide durante a embriogénese e pela manutenção da arquitectura normal da tiróide) foi proposto como gene de susceptibilidade para o FNMTc (Pereira *et al.*, 2013 – artigo submetido para publicação). No referido estudo, identificou-se uma variante germinal (c.743C>G; p.A248G) no gene *FOXE1* numa família com FNMTc e num caso aparentemente esporádico de NMTC, e estudos funcionais sugeriram que esta variante poderia estar envolvida na tumorigénese da tiróide (Pereira *et al.*, 2013).

6.1 Gene *DICER1*

A *DICER1* é uma endoribonuclease da família das RNases III, que é essencial para o processamento dos microRNAs (miRNAs) (Heravi-Moussavi *et al.*, 2012). Os miRNAs são uma classe funcional de pequenas moléculas de RNA (possuem cerca de 19-22 nucleótidos) não-codificantes, que regulam negativamente a expressão dos genes a nível pós-transcricional, através da ligação a sequências complementares, nas regiões 3'- não traduzidas (3'-UTR-*Untranslated Regions*) dos mRNAs alvo (Frezzetti *et al.*, 2011). Como consequência, os miRNAs inibem a síntese proteica, a nível da tradução e/ou pela promoção da degradação dos mRNAs (Frezzetti *et al.*, 2011).

Os miRNAs têm sido identificados em muitos organismos diferentes, desde plantas aos humanos, e estima-se que estes regulem 30% dos genes conhecidos (Frezzetti *et al.*, 2011). Alguns miRNAs são expressos de forma ubíqua, enquanto outros exibem um padrão de expressão específico de tecido (Frezzetti *et al.*, 2011). A expressão incorrecta dos miRNAs pode perturbar a embriogénese, a organogénese e a homeostasia dos tecidos (Frezzetti *et al.*, 2011).

Os miRNAs, geralmente, são transcritos como miRNAs primários (pri-miRNAs), que são subsequentemente clivados pela enzima nuclear Drosha e pela sua proteína parceira, a DGCR8, em moléculas precursoras de miRNAs (pré-miRNAs), que contêm entre 60-70 nucleótidos (Frezzetti *et al.*, 2011). Os pré-miRNAs são posteriormente transportados para o citoplasma, onde são clivados pela enzima *DICER1* e pela sua proteína parceira, a TRBP, em duplexes de miRNAs maduros (estes contêm de 20-25 nucleótidos) (Frezzetti *et al.*, 2011). Os duplexes de miRNA são desenrolados pela enzima helicase (Duroux-Richard *et al.*, 2011). De seguida, uma das cadeias é degradada, enquanto que a cadeia de miRNA madura é incorporada no RISC (Complexo de Silenciamento RNA-Induzido). A cadeia de miRNA madura direcciona o RISC para o mRNA alvo por emparelhamento com as sequências localizadas nas regiões 3'-UTR (Frezzetti *et al.*, 2011). Esta cadeia de miRNA leva à degradação do mRNA alvo, se a complementaridade for perfeita, ou à interacção com o complexo iniciação da tradução e inibição da síntese proteica, se a complementaridade for apenas parcial (Nikiforova *et al.*, 2009) (Figura I.7).

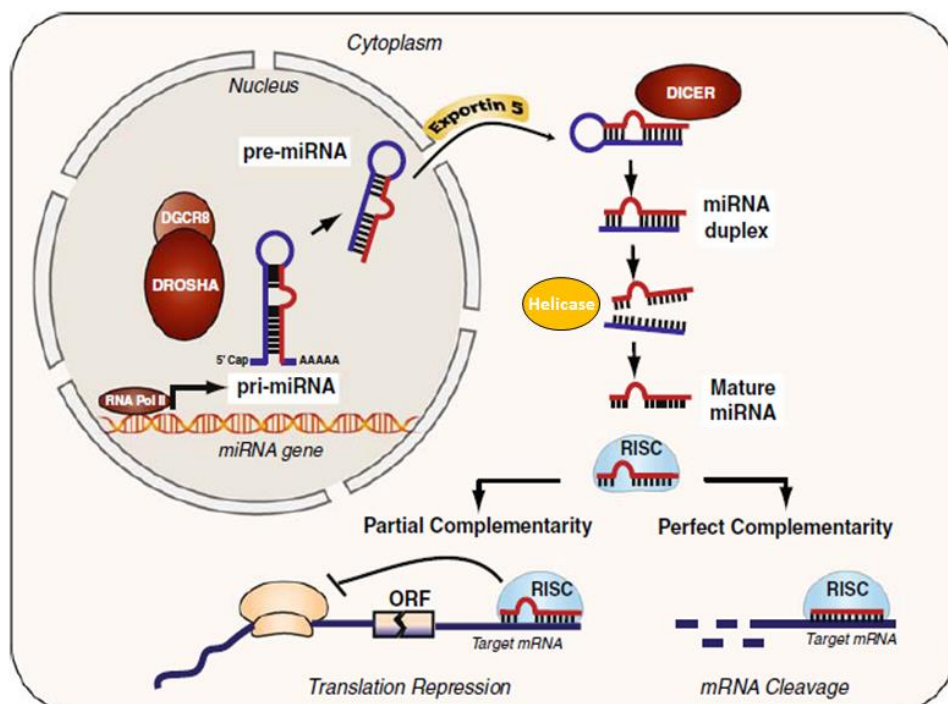


Figura I.7 - Representação esquemática da biossíntese dos miRNAs (Nikiforova *et al.*, 2009).

A DICER1 humana é uma proteína de 220 kDa que possui 7 domínios estruturais: um domínio PAZ, um domínio de ligação ao RNA de cadeia dupla (dsRBD), um domínio ATPase /RNA helicase, dois domínios RNase III, o domínio RNase IIIa e o domínio RNase IIIb, um domínio Plataforma (*Platform*) e um domínio de função desconhecida (DUF283) (Vermeulen, 2005). Os dois domínios do tipo RNase III formam um dímero intramolecular para criar um único centro activo, responsável pela clivagem do RNA de cadeia dupla, enquanto que os domínios dsRBD e PAZ desempenham um papel no reconhecimento e ligação aos substratos (Vermeulen, 2005) (Figura I.8).

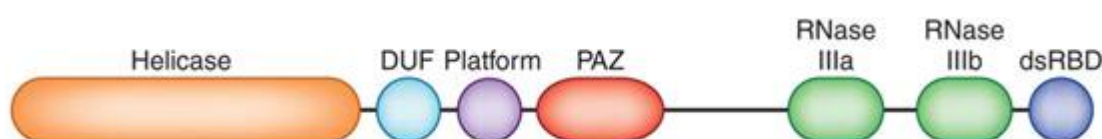


Figura I.8 - Representação esquemática dos domínios da DICER1 humana (Sawth e Duchaine, 2012).

Com base no conhecimento actual acerca da biogénese dos miRNAs, é esperado que a perda de alelos funcionais do gene *DICER1* bloqueie a maturação dos pré-microRNAs, perturbando qualquer circuito regulatório em que os miRNAs estejam envolvidos (Frezza *et al.*, 2011). Sabe-se que a subexpressão da DICER1 se correlaciona com um pior prognóstico em muitos carcinomas (Heravi-Moussavi *et al.*, 2012). Em modelos de ratinhos com retinoblastoma, a perda de um único alelo do gene *DICER1* (haploinsuficiência) aumentou a taxa de desenvolvimento tumoral, quando comparados com animais controlo (Lambertz *et al.*, 2010; Heravi-Moussavi *et al.*, 2012). Observou-se que, a inactivação de um dos alelos do gene

DICER1 nos membros, pulmões, sistema nervoso central, próstata e músculos de ratinhos resultou em diferentes defeitos morfológicos e num desenvolvimento aberrante (Harris *et al.*, 2006; Kawase-Koga *et al.*, 2009; Harfe *et al.*, 2005). A deficiência do *DICER1* afectou ainda a função de diferentes órgãos nestes ratinhos, tais como o coração, o fígado, os rins e o pâncreas (Harvey *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2008; Frezzetti *et al.*, 2011).

Frezzetti e colaboradores realizaram o *knockout* de um dos alelos do gene *DICER1* em embriões de ratinhos, e observaram que o desenvolvimento e/ou diferenciação da glândula tiroideia permaneceram inalterados (Frezzetti *et al.*, 2011). No entanto, após o nascimento, os ratinhos com *knockout* do *DICER1* desenvolveram hipotiroidismo severo e uma desorganização progressiva da estrutura folicular da tiróide. Estas alterações sugerem que a função do gene *DICER1* é determinante para a função normal da tiróide em estádios mais tardios do desenvolvimento (Frezzetti *et al.*, 2011).

Recentemente, num estudo realizado por Rodriguez *et al.*, observou-se que, em ratinhos com o gene *DICER1* mutado, com o aumento da idade, o tecido da tiróide destes apresentava alterações características dos processos neoplásicos, tais como: uma proliferação excessiva de células foliculares, uma contínua desdiferenciação no centro da glândula tiroideia, acompanhada pela perda de expressão de diferentes factores de transcrição (PAX8, FOXE1, NIS e TPO) (Rodriguez *et al.*, 2012).

Análises *in silico* do genoma do cancro humano têm revelado a frequente deleção do gene *DICER1*, contudo não tem sido reportado que este gene sofra uma deleção homozigótica, sugerindo que o gene *DICER1* é haploinsuficiente nos tumores humanos. Estes estudos sugerem que o gene *DICER1* pode ser um importante gene supressor de tumor haploinsuficiente (Kumar *et al.*, 2009; Lambertz *et al.*, 2010).

Diferentes publicações têm reportado mutações germinais no gene *DICER1* em famílias com blastoma pleuropulmonar (PPB – *Pleuropulmonary Blastoma*) (Hill *et al.*, 2009; Frio *et al.*, 2011). O PPB é um tumor pediátrico dos pulmões, raro, que surge durante o desenvolvimento fetal dos pulmões (Hill *et al.*, 2009; Frio *et al.*, 2011). Hill *et al.* estudaram 11 famílias com PPB e identificaram nestas 11 famílias mutações germinais no gene *DICER1* (Hill *et al.*, 2009; Frio *et al.*, 2012). Estas famílias apresentavam crianças com PPB, nefroma quístico ou rabdomiossarcoma embrionário (Hill *et al.*, 2009; Frio *et al.*, 2011). Algumas famílias com PPB apresentavam também bócio multinodular e tumores das gónadas (Frio *et al.*, 2011).

Recentemente, Frio e colaboradores seleccionaram 53 indivíduos de 2 famílias (1 destas foi a família estudada por Bignell *et al.*, onde se identificou o locus *MNG1*) que apresentavam MNG e de 3 famílias que apresentavam MNG associado a tumores de células *Sertoli-Leydig* do ovário (SLCT, *Sertoli-Leydig Cell Tumors*) (Frio *et al.*, 2011). Estes investigadores identificaram e caracterizaram mutações germinais no gene *DICER1* em 37 indivíduos das famílias seleccionadas, e concluíram que seria esperado que as alterações no gene *DICER1*

conduzissem à formação de proteínas truncadas ou à formação de proteínas com alterações conformacionais no domínio PAZ (Frio *et al.*, 2011) (Figura I.9).

Num outro estudo realizado por Heravi-Moussavi e colaboradores, foram pesquisadas alterações no gene *DICER1* em células somáticas de diferentes tipos de tumores do ovário: tumores de células *Sertoli-Leydig*, tumores de células da granulosa juvenil e tumores de saco vitelino (Heravi-Moussavi *et al.*, 2012). Neste estudo, detectaram-se diferentes mutações *missense* no gene *DICER1*, e observou-se que estas alterações abrangiam especificamente os codões que codificavam locais metal-ligantes no domínio RNase IIIb da proteína. Neste estudo, foram ainda identificadas outras mutações somáticas e germinais (Heravi-Moussavi *et al.*, 2012) (Figura I.9).

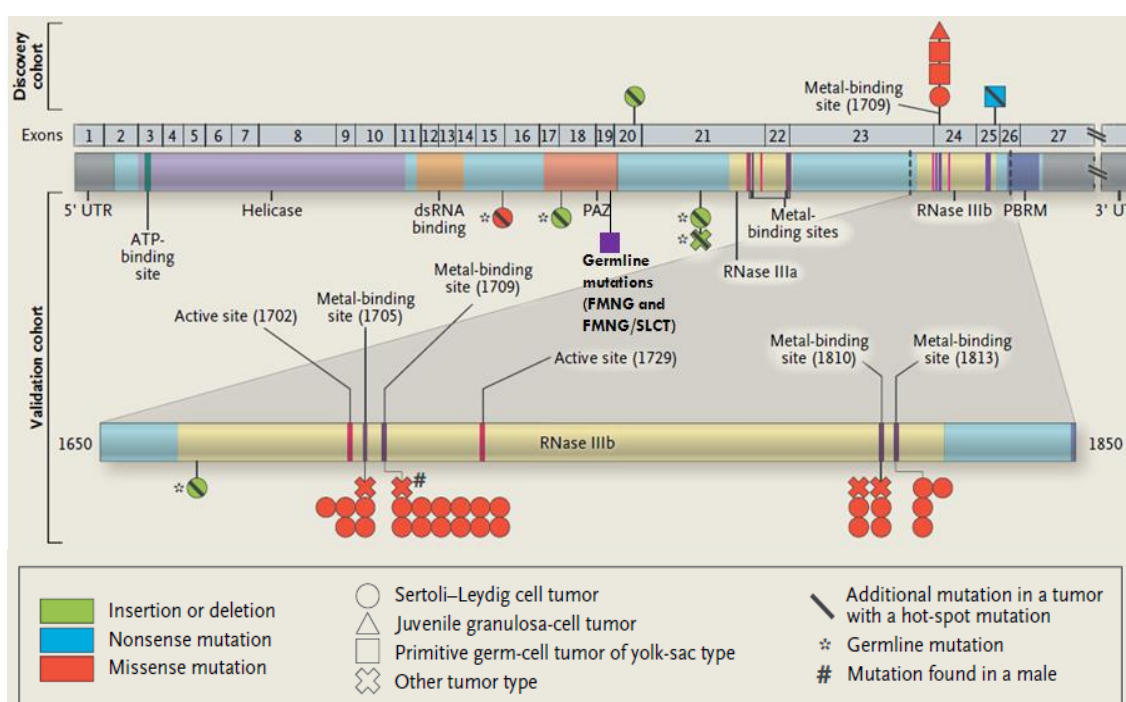


Figura I.9 - Representação das mutações encontradas no gene *DICER1*. Nesta figura encontram-se assinaladas de forma geral (pelo quadrado roxo) as mutações germinais identificadas em famílias com MNG ou FMNG/SLCT no estudo de Frio *et al.* Nesta representação estão também assinaladas as mutações identificadas por Heravi-Moussavi *et al.*: mutações em tumores de células *Sertoli-Leydig* do ovário (assinaladas pelos círculos), mutações em células da granulosa juvenil (assinaladas pelos triângulos) e mutações em tumores de saco vitelino (assinaladas pelos quadrados), as cruzes representam outro tipo de tumor. A verde encontram-se representadas as deleções ou inserções, a azul as mutações *nonsense* e a vermelho as mutações *missense* (adaptado de Heravi-Moussavi *et al.*, 2012; Frio *et al.*, 2012).

6.2 Gene *C8orf48*

O estudo de mapeamento genético realizado anteriormente pelo nosso grupo numa família Portuguesa com FNMTTC (família 1), sugeriu que o gene de susceptibilidade para as neoplasias da tiróide na referida família estaria no cromossoma 8p23-p22 na região 9 000 000 - 17 000 000 bp (Cavaco *et al.*, 2008b).

O envolvimento do gene *C8orf48* no FNMTTC foi recentemente descrito num trabalho realizado pelo nosso grupo e ainda não publicado (Pereira, 2012). Através da análise da sequenciação global do exoma de um indivíduo da família 1, foi identificada uma variante potencialmente patogénica no gene *C8orf48*, localizado no cromossoma 8p23-p22 (Pereira, 2012). A variante no gene *C8orf48* foi detectada em heterozigotia e resultava da transição de uma citosina para uma timina (c.65C>T), que é esperado conduzir à substituição de um resíduo treonina por um resíduo isoleucina no codão 22 deste gene (p.T22I) (Pereira, 2012). Esta variante quando detectada, ainda não tinha sido descrita na literatura ou em bases de dados, no entanto, recentemente, observou-se que esta tinha sido descrita na base de dados ENSEMBL, num indivíduo de uma população de 285 descendentes de Europeus.

O estudo de segregação revelou que, para além do probando, 15 familiares deste (13 apresentavam doença tiroideia e 2 eram normais) também apresentavam a variante c.65C>T no gene *C8orf48* (Pereira, 2012). Observou-se ainda que, esta variante genética não se encontrava presente em 50 controlos normais, não sendo por isso um polimorfismo comum na população Portuguesa (Pereira, 2012).

A nível funcional pouco se sabe acerca do gene *C8orf48*. Na literatura, apenas foi descrita a interacção entre a proteína codificada pelo gene *C8orf48* e a proteína MDFI (codificada pelo gene *Myogenic repressor I-mf*) (Venkatesan *et al.*, 2009). A proteína MDFI estimula a via metabólica Wnt, através da ligação ao complexo formado pela axina, aumentando o nível de β -catenina livre. Na via Wnt, a ligação do ligando Wnt ao complexo receptor constituído pelas proteínas Fz e LRP5/6 conduz a uma série de eventos que destroem o complexo proteico APC/Axina/GSK3 (Komiya e Habas, 2008). Este complexo proteico é necessário para a degradação da β -catenina (Komiya e Habas, 2008).

Após a destruição do complexo APC/Axina/GSK3, ocorre um aumento do nível de β -catenina livre no citoplasma (Komiya e Habas, 2008). Posteriormente, a β -catenina livre desloca-se para o núcleo da célula, local onde esta se complexa com membros da família LEF/TCF, funcionando como co-activador transcricional de genes-alvo (Komiya e Habas, 2008) (Figura I.10). A expressão de alguns genes-alvo cuja expressão é regulada pela ligação da β -catenina aos seus promotores, no estudo da interacção da proteína codificada pelo gene *C8orf48* com a via Wnt, foi analisada com *micro-arrays* de oligonucleótidos (estudo realizado pelo Dr. Jaime Pita).

A análise de *micro-arrays* revelou que os genes *CLDN1*, *CD44*, *CCND1* e *MYC* se encontravam sobre-expressos no tumor do probando da família com FNMTTC onde se identificou a variante c.65C>T, uma vez que se observou existir uma diferença significativa na expressão destes genes entre o tecido tumoral e o tecido normal do probando da referida família. Este tumor também apresentava uma mutação somática no gene *BRAF* que poderá igualmente ter contribuído para o aumento de expressão dos referidos genes-alvo (Pereira, 2012).

Desta forma, estes estudos sugerem que a variante c.65C>T detectada no gene *C8orf48* possa afectar a regulação da via Wnt.

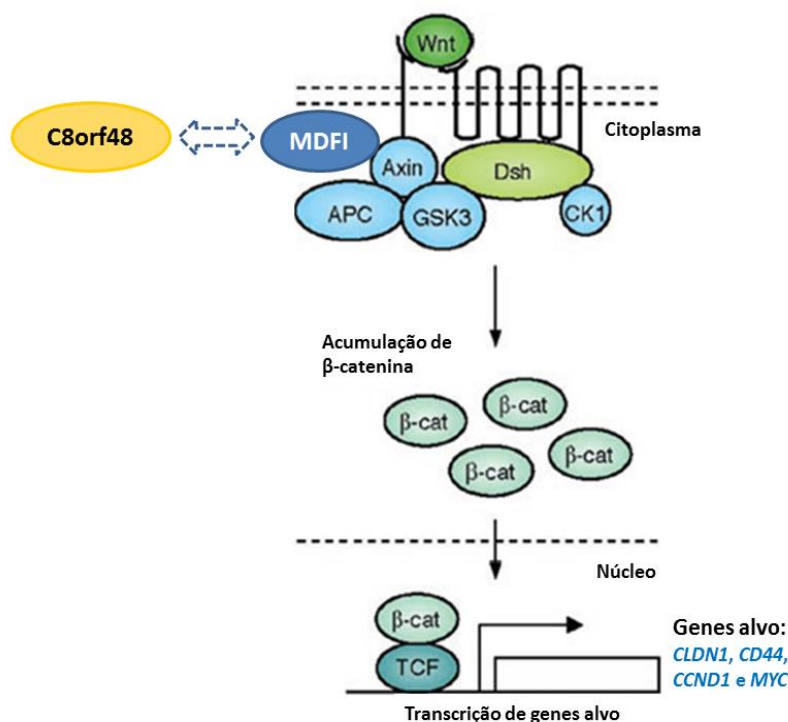


Figura I.10 - Representação esquemática da via de transdução de sinal Wnt. A proteína codificada pelo gene *C8orf48* interage com a proteína MDFI e esta por sua vez interage com a axina, que participa na regulação da via Wnt (adaptado de Komiyama e Habas, 2008).

7. Aplicação de novas tecnologias de sequenciação na identificação de genes de susceptibilidade para o FNMTCT

7.1 Sequenciação Global do Exoma

A sequenciação de Sanger dominou a investigação do genoma durante as últimas duas décadas (Shyr e Liu, 2013). Através desta técnica foi possível realizar a sequenciação completa do genoma humano (Shyr e Liu, 2013). O método de sequenciação de Sanger, utilizado no projecto do genoma humano fazia uso de um pequeno *primer* (normalmente com 20 pares de bases), que permitia que a reacção de sequenciação comesçasse exactamente no local que o investigador pretendia (Nuytemans e Vance, 2010). No entanto, o uso deste *primer* evitava qualquer aumento significativo na quantidade de sequenciação que podia ser realizada (Nuytemans e Vance, 2010). A solução para este problema foi eliminar o *primer* e criar milhões de pequenas reacções de sequenciação em paralelo (Nuytemans e Vance, 2010). Esta nova tecnologia foi designada de sequenciação de próxima geração (NGS-*Next-Generation Sequencing*) (Nuytemans e Vance, 2010).

As tecnologias de NGS permitem realizar a sequenciação de DNA em escala massiva, a baixo custo e podem ser utilizadas na investigação biomédica (Magalhães *et al.*, 2010). A

sequenciação de próxima geração é muito mais precisa do que a sequenciação de Sanger e permite sequenciar regiões muito amplas, com um grande número de genes ou todos os exões (sequências do genoma codificantes de proteínas) de todos os genes conhecidos, sendo designada de sequenciação global do exoma (WES- *Whole Exome Sequencing*) (Nuytemans e Vance, 2010). Os genes codificantes de proteínas constituem apenas cerca de 1% do genoma humano, contudo, é nestes que se encontram aproximadamente 85% das mutações patogénicas (Choi *et al.*, 2009).

A aplicação da NGS, principalmente através da sequenciação global do genoma e do exoma tem permitido identificar alterações genómicas envolvidas no desenvolvimento do cancro, incluindo mutações pontuais, pequenas inserções ou deleções, alterações no número de cópias e alterações estruturais (Shyr e Liu, 2013). A utilização da WES é também vantajosa, porque não é necessário seleccionar *a priori* genes candidatos, uma vez que se está a sequenciar todo o exoma (Nuytemans e Vance, 2010).

A genómica do cancro engloba duas classes de mutações, as *drivers* e as *passengers* (Greenman *et al.*, 2007). As mutações *drivers* conferem às células vantagem no crescimento, e estão implicadas no desenvolvimento do cancro, enquanto que as mutações *passengers* são biologicamente neutras e não conferem vantagem no crescimento celular (Greenman *et al.*, 2007). A WES está a abrir caminho para a identificação de mutações *drivers*, e para a detecção de eventos genéticos envolvidos no processo de metastização (Majewski *et al.*, 2011).

8. Objectivos

No presente projecto de Mestrado pretendeu-se identificar e caracterizar funcionalmente alterações genéticas envolvidas na susceptibilidade para o FNMTC. Os objectivos específicos deste projecto foram os seguintes:

- 1- Esclarecer o papel do gene *DICER1* no desenvolvimento de lesões da tiróide em indivíduos com formas familiares de carcinomas não-medulares da tiróide (FNMTC) e de bócio multinodular (FMNG), em associação ou não com tumores de células *Sertoli-Leydig* do ovário (SLCT).
- 2- Clarificar o papel da variante c.65C>T do gene *C8orf48*, identificada numa família com FNMTC, através de estudos funcionais *in vitro*.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Amostras biológicas

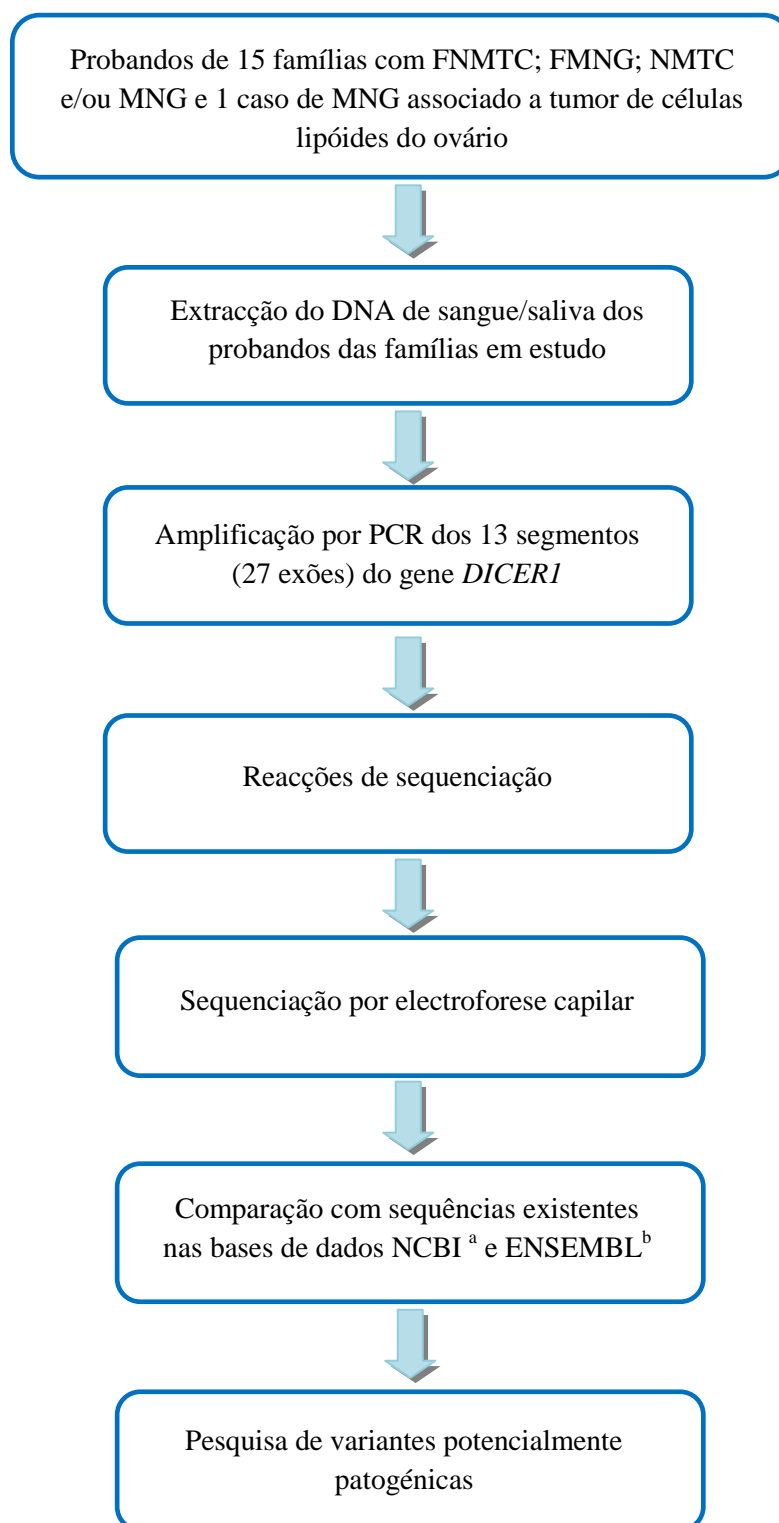
Para o estudo do gene *DICER1* seleccionou-se um total de 15 famílias e 1 doente sem história familiar. Estas famílias foram agrupadas em FNMTTC (*Familial Non-Medullary Thyroid Carcinoma*), FMNG (*Familial Multinodular Goiter*) e famílias com carcinomas não-medulares da tiróide (NMTC) e bócio multinodular (MNG), que não preenchiam os critérios para pertencer aos dois tipos de famílias anteriormente referidos. Neste projecto estudaram-se 7 famílias que apresentavam FNMTTC (famílias 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8), a família 2 para além de FNMTTC, apresentava um caso de tumores de células *Sertoli-Leydig* do ovário (SLCT). Analisaram-se ainda 4 famílias que apresentavam FMNG (famílias 9, 10, 11 e 12), 4 famílias que apresentavam NMTC e/ou MNG (famílias 13, 14, 15 e 16), e uma doente (referida nesta tese com o número 17) que apresentava MNG associado a tumor de células lipóides do ovário. Foi estudado o gene *DICER1* nos 15 probandos das famílias referidas anteriormente e na doente que não apresentava história familiar. As árvores genealógicas das famílias referidas encontram-se representadas na secção III desta tese.

Nesta tese, foi ainda estudado o intrão 22 do gene *DICER1* em 30 controlos normais (15 homens e 15 mulheres) da população Portuguesa.

Para o estudo do gene *C8orf48*, analisaram-se os indivíduos de uma família com FNMTTC (família 1, a árvore genealógica desta família encontra-se na secção III), cujo gene responsável foi mapeado pelo nosso grupo (ver Introdução).

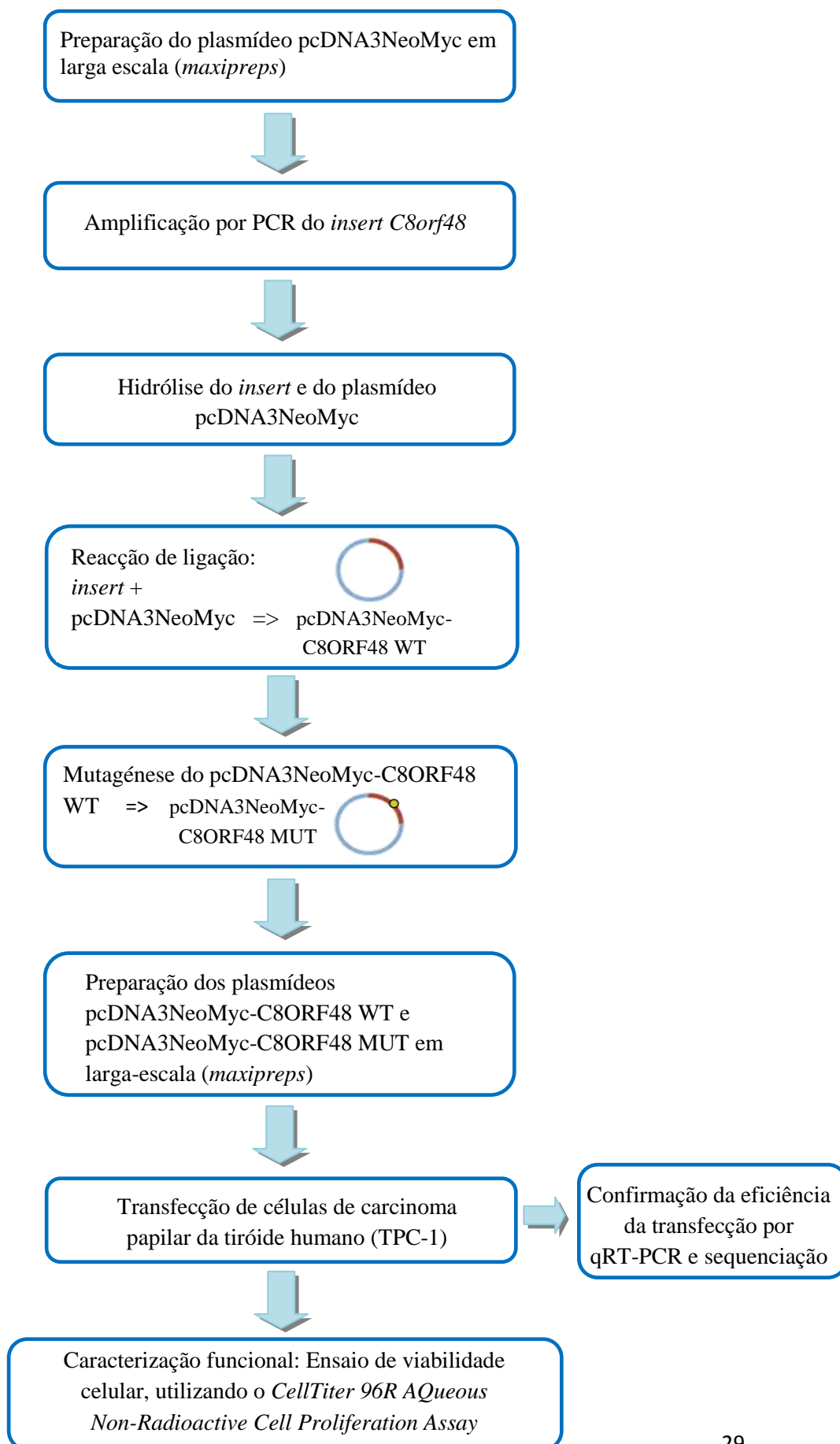
Em ambos os estudos, os doentes foram identificados pelo serviço de Endocrinologia do Instituto Português de Oncologia de Lisboa (IPO-Lisboa), e a recolha de sangue/saliva foi realizada após consentimento informado dos doentes e dos familiares. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do IPO-Lisboa.

Esquema representativo do procedimento experimental utilizado para o estudo do gene *DICER1*:



^a www.ensembl.org ; ^b <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Esquema representativo do protocolo efectuado para a caracterização funcional da variante p.T22I identificada no gene *C8orf48*.



2. Extracção de DNA

2.1 Extracção de DNA a partir de sangue periférico

Para a extracção de DNA a partir de leucócitos de sangue periférico, realizou-se a colheita de cerca de 3 ml de sangue periférico para um tubo contendo EDTA. Utilizou-se o *GENTRA PUREGENE DNA BLOOD KIT (QIAGEN, Alemanha)*. O protocolo realizado para a extracção de DNA foi o recomendado pelo fabricante, com algumas alterações.

Primeiramente, realizou-se a lise das células, para tal, colocou-se num tubo de 50 ml, 3 ml de sangue ao qual se adicionou 10 ml de solução de lise *RBC (Red-Blood Cells)*. Inverteu-se o tubo e incubou-se à temperatura ambiente durante 10 minutos. Centrifugou-se o tubo a 3000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5810R*, raio do rotor= 180 mm) durante 10 minutos, e desta forma obteve-se um *pellet* branco. De seguida, descartou-se o sobrenadante e colocou-se o tubo com o *pellet* a agitar no vortex. Adicionou-se 4 ml da solução de lise celular para ressuspender as células e homogeneizou-se com a pipeta para facilitar a lise. Incubou-se o tubo a 37°C, durante 30 minutos, até a solução ficar homogénea.

Para precipitar as proteínas, adicionou-se 1,4 ml de solução de precipitação de proteínas. Colocou-se o tubo no vortex a alta velocidade durante 20 segundos, para promover a agregação das proteínas. Centrifugou-se o tubo a 3000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5810 R*), durante 10 minutos à temperatura ambiente.

Por forma a precipitar o DNA, transferiu-se o sobrenadante (DNA) para um tubo de 50 ml contendo 3 ml de isopropanol puro (100%) e misturou-se o conteúdo do tubo por inversão (lentamente) até aparecer uma “nuvem branca” de DNA. Retirou-se o DNA do tubo com uma ansa e lavou-se em 1 ml de solução de etanol de 70% (v/v). Secou-se o DNA na ansa ao ar.

Por último, realizou-se a hidratação do DNA, para tal, mergulhou-se a ansa num tubo contendo 250 µl de solução de hidratação. Re-hidratou-se o DNA por incubação a 65°C, durante 30 minutos. Armazenou-se a solução de DNA a 4°C e, posteriormente, realizou-se a quantificação da sua concentração por espectrofotometria (ver ponto 4 desta secção). Por forma a conservar a solução de DNA durante mais tempo, esta foi armazenada a -20°C.

2.2 Extracção de DNA a partir de saliva

Realizou-se a colheita de saliva utilizando zaragatoas. Por forma a extrair o DNA a partir da saliva utilizou-se o *innuPREP Swab DNA Kit (Analytik Jena, Alemanha)* e seguiu-se o protocolo recomendado pelo fabricante, com algumas alterações.

Cortou-se a extremidade da zaragatoa com uma tesoura limpa com etanol 70% (v/v) e colocou-se essa extremidade num tubo de 1,5 ml. Adicionou-se 400 µl da solução de lise TLS e 25 µl de proteinase K. Agitou-se o tubo no vortex vigorosamente. Incubou-se o tubo a 50°C durante 15 minutos e durante a incubação agitou-se o tubo no vortex cerca de 4 vezes.

Após a lise celular, transferiu-se a extremidade da zaragatoa e o líquido para uma coluna *prefilter*. Colocou-se a coluna dentro de um tubo colector de 2 ml. Centrifugou-se o tubo a 12000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*, raio do rotor = 95 mm) durante 1 minuto, e posteriormente descartou-se a coluna com a zaragatoa. De seguida, adicionou-se 400 µl de solução de ligação TBS ao eluído, no tubo colector. Homogeneizou-se a solução. Colocou-se esta mistura numa coluna *spin filter*, e aplicou-se a coluna num novo tubo colector de 2 ml. Centrifugou-se o tubo a 12000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) durante 2 minutos. Descartou-se o tubo colector e transferiu-se a coluna para um novo tubo colector.

Seguidamente, adicionou-se 500 µl de solução de lavagem HS. Centrifugou-se a 12000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) durante 1 min. Descartou-se o tubo colector e transferiu-se a coluna para um novo tubo colector. Adicionou-se à coluna 750 µl de solução de lavagem MS. Centrifugou-se a 12000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) durante 1 minuto. Descartou-se o tubo colector e transferiu-se a coluna para um novo tubo colector. Centrifugou-se a 14000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) durante 2 minutos, para remover qualquer resíduo de etanol. Descartou-se o tubo colector e transferiu-se a coluna para um tubo de 1,5 ml.

Por último, para eluir o DNA, adicionou-se 100 µl de solução de eluição (*Elution Buffer*) à coluna. Incubou-se durante 1 minuto à temperatura ambiente. Centrifugou-se o tubo a 8000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) durante 1 minuto para recuperar o DNA. Posteriormente, quantificou-se a concentração de DNA obtida por espectrofotometria (ver ponto 4 desta secção) e armazenou-se o tubo a 4°C. Para uma conservação a longo prazo, armazenou-se a solução de DNA a -20°C.

3. Extracção de RNA

3.1 Extracção de RNA a partir de células de carcinoma papilar da tiróide (TPC-1)

Para se realizar a extracção de RNA a partir de células TPC-1, seguiu-se o protocolo recomendado pelo fabricante do *RNeasy Mini Kit* (*QIAGEN*, Alemanha), com algumas alterações.

Primeiramente, propagaram-se as células TPC-1 em placas de cultura celular de 6 poços. Quando a confluência celular nestas placas atingiu os 100% fez-se a recolha das células. Para tal, removeu-se o meio de cada poço, lavou-se uma vez com 2 ml de uma solução salina de PBS sem magnésio e sem cálcio (*Phosphate Buffared Saline -Mg²⁺/Ca²⁺*; *GIBCOTM*, *InvitrogenTM*, *Life Technologies*, EUA). Adicionou-se 100 µl de tripsina (*GIBCOTM*) a cada poço e incubaram-se as placas, durante 5 minutos a 37°C. Neutralizou-se a tripsina com 750 µl de meio não suplementado e transferiu-se a suspensão celular para um tubo de 15 ml. De seguida, lavou-se cada poço com mais 750 µl de meio não suplementado e transferiu-se o meio para o mesmo tubo. Posteriormente, centrifugou-se o tubo a 1200 rpm (*Labofuge 400*, *Heraeus Instruments*,

raio do rotor = 170 mm), durante 5 minutos e removeu-se completamente o sobrenadante. Lavou-se o *pellet* celular com 700 µl de PBS e centrifugou-se novamente, a 1200 rpm (*Labofuge 400, Heraeus Instruments*) durante 5 minutos. Rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* celular em 600 µl de tampão de lise RLT com β-mercapto-etanol 10% (v/v). Agitou-se o tubo no vortex, durante 10 segundos, e armazenou-se a -70°C.

Na continuação do protocolo, homogeneizou-se o lisado celular com uma agulha de 20 G, por forma a fragmentar o DNA. Transferiu-se o lisado para um tubo de 2 ml, adicionou-se um volume igual de etanol a 70% (v/v, em água estéril tratada com DEPC) e homogeneizou-se com uma pipeta. Transferiu-se a amostra (até 700 µl) para uma coluna *RNeasy*, num tubo de 2 ml. Centrifugou-se a amostra a 10000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) durante 30 segundos. Quando o volume da amostra excedeu os 700 µl, realizou-se uma segunda centrifugação, em condições iguais às anteriores.

Adicionou-se 700 µl de tampão RW1 à coluna *RNeasy* e centrifugou-se a 10000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) durante 30 segundos, para lavar a membrana da coluna. Descartou-se o eluído e adicionou-se 500 µl de tampão RPE à coluna *RNeasy*. Centrifugou-se a 10000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) durante 30 segundos. Descartou-se o eluído e adicionou-se, novamente, 500 µl de tampão RPE à coluna. Centrifugou-se o tubo a 10000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) durante 2 minutos, para remover completamente os resíduos de etanol da membrana da coluna. De seguida, descartou-se o eluído e centrifugou-se a 14000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) durante 1 minuto.

Transferiu-se a coluna para um novo tubo colector de 1,5 ml e adicionou-se 40 µl de água *RNase-free* directamente à membrana da coluna. Após 5 minutos, centrifugou-se a amostra a 10000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) durante 1 minuto, para eluir o RNA. Por fim, quantificou-se o RNA obtido por espectrofotometria (ver ponto 4 desta secção) e armazenou-se este a -70°C.

4. Quantificação espectrofotométrica do DNA e RNA

Por forma a quantificar o DNA e o RNA extraídos a partir de amostras biológicas realizou-se o doseamento espectrofotométrico. Nos ácidos nucleicos, as purinas e as pirimidinas que os constituem absorvem radiação ultravioleta (UV) (Sambrook e Russel, 2001). Tal como descrito pela lei de Lambert-Beer, a absorvância de uma determinada amostra, a um comprimento de onda específico e a uma espessura fixa é directamente proporcional à concentração do material absorvente, ou seja (Sambrook e Russel, 2001):

$A = \epsilon bc$, em que A é a absorvância, ϵ é o coeficiente de extinção molar ($M^{-1}cm^{-1}$), b é a espessura da célula (cm) e c é a concentração da amostra (M).

As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 260 nm e a 280 nm (*Thermo Scientific Nanodrop 2000*, EUA). A leitura a 260 nm permite o cálculo da concentração de ácidos nucleicos na amostra. Uma absorvância ou densidade óptica (DO) de 1 corresponde a uma concentração de 50 µg/ml para o DNA em cadeia-dupla, e a 40 µg/ml para o DNA em cadeia simples ou para o RNA. Assim, a concentração de ácidos nucleicos é determinada pelas seguintes equações (Sambrook e Russel, 2001):

$$[\text{DNA}](\text{ng}/\mu\text{l}) = A_{260} \times 50\text{ng}/\mu\text{l} \times \text{factor de diluição}$$

$$[\text{RNA}](\text{ng}/\mu\text{l}) = A_{260} \times 40\text{ng}/\mu\text{l} \times \text{factor de diluição}$$

A razão entre as leituras a 260 nm e a 280 nm ($\text{DO}_{260} : \text{DO}_{280}$) fornece uma estimativa da pureza dos ácidos nucleicos. As amostras puras de DNA e de RNA têm valores de $\text{DO}_{260} : \text{DO}_{280}$ de 1,8 e 2,0; respectivamente. Se existir uma contaminação significativa com proteínas ou fenol, as razões de $\text{DO}_{260} : \text{DO}_{280}$ apresentarão valores inferiores aos acima referidos, e desta forma não será possível fazer uma quantificação precisa da concentração de ácido nucleico (Sambrook e Russel, 2001).

5. Síntese de cDNA por transcrição reversa do RNA

O RNA extraído a partir de células TPC-1 foi utilizado para a síntese do DNA complementar de cadeia simples (cDNA). Na síntese de cDNA são utilizados *primers* aleatórios (*random primers*) que hibridam com os diferentes RNAs mensageiros que existem na célula. A extensão dos *primers* é realizada por uma enzima que utiliza como molde o RNA para a síntese de cDNA, a enzima transcriptase reversa. Posteriormente, a partir do cDNA obtido realiza-se a amplificação por PCR dos exões dos genes que se pretendem estudar.

Para a síntese de cDNA, primeiramente, realizou-se o tratamento do RNA obtido com desoxiribonuclease I (DNase I) por forma a eliminar o DNA, pois a enzima DNase I possui a capacidade de digerir o DNA tanto em cadeia simples como em cadeia dupla. Para o tratamento do RNA com DNase I preparou-se, em gelo, a seguinte mistura reaccional: 1 µg de RNA, uma solução tamponada *10x DNase I reaction buffer* (*InvitrogenTM*, *Life Technologies*, EUA), 2 U de desoxiribonuclease I (1 U/µl, *InvitrogenTM*), 20 U de inibidor de RNase (*RNaseOutTM* *Recombinant Ribonuclease Inhibitor*) (40 U/µl, *InvitrogenTM*) e água bidestilada estéril para perfazer o volume final de 20 µl. Homogeneizou-se bem a mistura reaccional e colocou-se o tubo à temperatura ambiente durante 12 minutos. Posteriormente, incubou-se a amostra a 65°C durante 10 minutos, realizou-se um *spin down* do tubo e colocou-se este em gelo.

De seguida, realizou-se a reacção de síntese do cDNA, para tal, prepararam-se duas misturas reaccionais. Na primeira mistura reaccional, juntou-se os 20 µl do RNA tratado com DNase, com 2 µl de desoxirribonucleótidos (dNTPs) (10 mM, *InvitrogenTM*) e 0,5 µl de *random primers* (*InvitrogenTM*). Homogeneizou-se a mistura reaccional, incubou-se a 65°C durante 5

minutos, fez-se o *spin down* do tubo e colocou-se este em gelo. Na segunda mistura reaccional, juntou-se 100 mM de ditioneitol (DTT) (*InvitrogenTM*), 20 U de *RNaseOutTM* (40 U/ μ l, *InvitrogenTM*), uma solução tamponada 5x *First-Strand Buffer* (*InvitrogenTM*), 200 U de transcriptase reversa *SuperScript II RT* (200 U/ μ l, *InvitrogenTM*) e água bidestilada estéril para perfazer o volume final de 12,5 μ l. Homogeneizou-se a mistura, adicionou-se os 12,5 μ l da segunda mistura reaccional aos 22,5 μ l da primeira mistura, fez-se o *spin down* do tubo, transferiu-se a mistura para tubos de PCR. No termociclador (*T3 thermocycler*, *Biometra*, Alemanha), incubou-se a reacção a 42°C durante 60 minutos, e posteriormente, inativaram-se as enzimas intervenientes na reacção a 70°C durante 15 minutos. Os cDNAs obtidos foram armazenados a -20°C.

6. Amplificação do DNA por PCR

O PCR (*Polimerase Chain Reaction*) é um método *in vitro* que permite sintetizar sequências de DNA específicas, utilizando dois *primers* oligonucleotídicos que hibridam com as cadeias de DNA molde (ou *template*) (Elrich, 1989). A primeira demonstração do processo de PCR foi realizada por Saiki e colaboradores em 1985. Em 1988, a técnica de PCR foi modificada, através da introdução na reacção de uma polimerase termoestável (Saiki *et al.*, 1988).

Devido à extensão dos *primers*, os produtos sintetizados num ciclo de PCR podem servir como

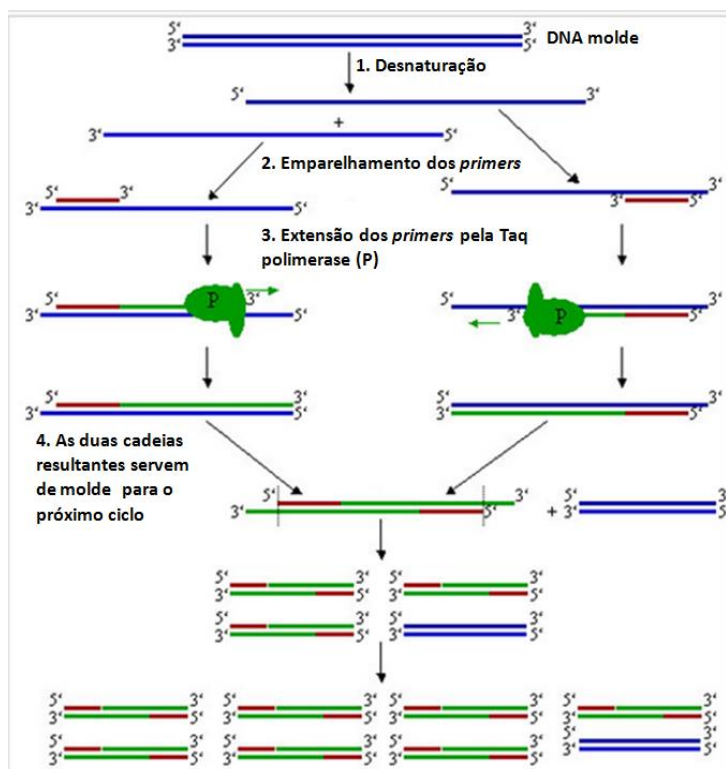


Figura II.1 - Esquema representativo de uma reacção de PCR (adaptado de http://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/genomics/pcr.html).

molde no próximo ciclo, assim sendo, o número de cópias de DNA alvo duplica em cada ciclo (Elrich, 1989). Como consequência, um conjunto repetitivo de ciclos resulta na acumulação exponencial de fragmentos específicos de DNA (Elrich, 1989). Cada ciclo de PCR é constituído por três passos: um passo de desnaturação do DNA molde pelo calor, um passo de hibridação dos *primers* com as sequências alvo em cadeia simples e um passo de extensão dos *primers*

emparelhados, efectuado por uma DNA polimerase termoestável (Sambrook e Russel, 2001) (Figura II.1).

Neste projecto, as reacções de PCR foram preparadas num volume final de 25 μ l, apresentando a seguinte composição: 100 ng de DNA molde, 1,2 a 1,9 mM de $MgCl_2$ (dependendo das condições óptimas de cada reacção; *Bioline*TM, Reino Unido; *Invitrogen*TM, *Life Technologies*, EUA), 0,2 mM de dNTPs (*Invitrogen*TM), 10 pmol de *primer forward* (*Sigma-Aldrich*, EUA) e de *primer reverse* (*Sigma-Aldrich*), solução tamponada de PCR (1x concentrada) (*Bioline*TM; *Invitrogen*TM), 1 U de *Taq DNA polymerase* (*Bioline*TM; *Invitrogen*TM) e água bidestilada estéril para perfazer o volume final.

Para cada reacção de PCR foi realizado simultaneamente um controlo negativo, constituído por uma mistura reaccional semelhante à das reacções de PCR, mas contendo água em substituição do DNA. O controlo negativo foi sujeito às mesmas condições que as reacções de PCR e foi utilizado para detectar a existência de possíveis contaminações.

As reacções de PCR foram processadas num termociclador (*Biometra*, Alemanha) e consistiram de 32 ou 35 ciclos de amplificação. As condições utilizadas foram as seguintes: a desnaturação inicial do DNA molde foi realizada a 95°C durante 5 minutos, seguindo-se os ciclos de amplificação. Cada ciclo de amplificação incluiu: a) a desnaturação do DNA molde a 95°C durante 45 segundos; b) o emparelhamento dos *primers* com o DNA molde à temperatura de hibridação de 56-60°C (dependendo das condições óptimas de cada reacção) durante 35 segundos; c) a extensão das novas cadeias a 72°C durante 50 segundos ou a 1 minuto e 50 segundos. Os tempos de extensão mais longos foram utilizados para amplificar fragmentos de DNA com um maior número de pares de bases. Após os ciclos de amplificação foi realizada uma extensão final a 72°C, durante 10 minutos.

7. Optimização das condições de PCR

Inicialmente, antes de se amplificar o DNA de cada amostra sob estudo, as condições de PCR foram optimizadas, testando-se diferentes graus de estrigência para a reacção. Para cada par de *primers* seleccionaram-se várias concentrações de $MgCl_2$ e várias temperaturas de hibridação.

O $MgCl_2$ é essencial para as reacções de PCR, pois os iões Mg^{2+} funcionam como co-factor da enzima *Taq DNA polymerase* e formam um complexo solúvel com os dNTPs (Sambrook e Russel, 2001). A concentração de magnésio pode também afectar a hibridação dos *primers*, a especificidade do produto de PCR e a formação de dímeros de *primers* (Innis *et al.*, 1990). Geralmente, uma baixa concentração de Mg^{2+} conduz a baixos rendimentos da reacção ou até mesmo à ausência de produtos de PCR, enquanto que concentrações elevadas de Mg^{2+} podem conduzir à acumulação de produtos inespecíficos (Sambrook e Russel, 2001).

A temperatura de hibridação também desempenha um papel crítico nas reacções de PCR. Se a temperatura de hibridação for demasiado elevada, a hibridação dos *primers* com o DNA *template* é fraca e assim, o rendimento do DNA amplificado é muito baixo (Sambrook e Russel, 2001). Se a temperatura de hibridação for demasiado baixa, pode ocorrer a hibridação inespecífica dos *primers*, resultando na amplificação de segmentos de DNA não desejados (Sambrook e Russel, 2001).

De um modo geral, a optimização das condições de PCR foi realizada utilizando duas concentrações de $MgCl_2$ (1,2 e 1,8 mM) e duas temperaturas de hibridação (56 e 60°C). Por último, seleccionou-se a concentração de $MgCl_2$ e a temperatura de hibridação para as quais se observou um melhor rendimento do produto pretendido.

8. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

O PCR quantitativo em tempo real permite quantificar os níveis de expressão de um determinado gene em diferentes amostras.

O qRT-PCR utiliza moléculas *reporter* fluorescentes para monitorizar a quantidade de produto amplificado em cada ciclo da reacção de PCR (Bustin *et al.*, 2005). Existem dois métodos de detecção dos produtos de PCR: o *Taqman* e o *SYBR Green* (Roche Applied Science, Alemanha). Neste projecto foi utilizado o método de *SYBR Green*. O fluoróforo *SYBR Green* detecta os produtos gerados por PCR através da ligação às duplas cadeias de DNA formadas durante esta reacção. Neste método, a polimerase amplifica a sequência de DNA alvo durante o PCR, originando os produtos. De seguida, o fluoróforo *SYBR Green* liga-se a cada nova cópia de dupla

cadeia de DNA. À medida que o PCR progride, mais produto é gerado, e o fluoróforo *SYBR Green* liga-se a todas as novas cópias de DNA em cadeia dupla existentes, resultando num aumento na intensidade da fluorescência. O aumento da intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de produto de PCR produzido (Figura II.2).

Durante os ciclos de PCR iniciais, o sinal de fluorescência emitido pelo *SYBR Green* ligado ao produto de PCR é normalmente muito fraco para se registar acima da linha de base. A linha

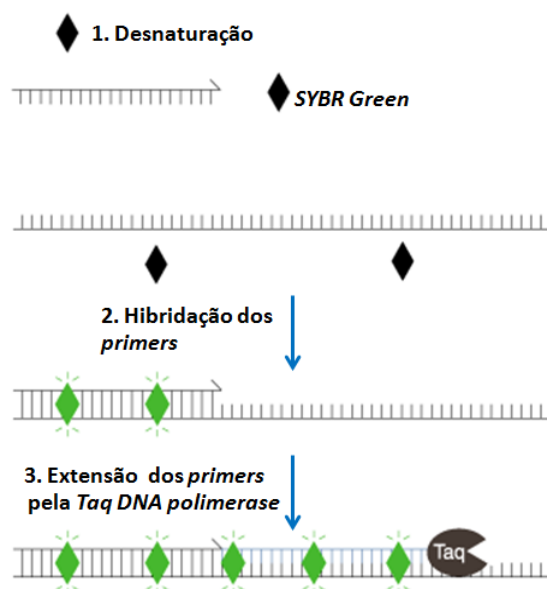


Figura II.2 - Esquema representativo do sistema *SYBR Green* (adaptado de <http://www.b2b.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Nucleic-Acid-Detection-and-Genomics-Technology/Nucleic-Acid-Detection-and-Quantitation-in-Solution.html>).

de base é normalmente definida entre os 3 e os 15 ciclos. O Ct, o ciclo de *threshold*, designa-se como o número de ciclos necessários para que o sinal de fluorescência exceda a linha de base. Durante a fase exponencial do PCR, a fluorescência duplica em cada ciclo. Após os 35 ciclos, a intensidade do sinal de fluorescência começa a ficar estável, indicando que o PCR atingiu o estado de saturação.

Geralmente, é possível fazer dois tipos de quantificação no qRT-PCR: uma quantificação relativa ou uma quantificação absoluta (método da curva-padrão). Na quantificação relativa, normalmente, é escolhida uma amostra de referência (também designada de calibrador), e a expressão do gene de interesse em todas as amostras em estudo é expressa como um aumento ou uma diminuição em relação ao calibrador. Este tipo de quantificação é utilizada para analisar as variações fisiológicas na expressão de um determinado gene.

No método da curva-padrão, uma amostra de concentração conhecida, que expressa o gene de interesse, é utilizada para a construção de uma curva-padrão, ou seja, uma relação linear entre o Ct e o logaritmo da quantidade de cDNA alvo existente na amostra padrão. Esta curva é construída a partir de uma série de diluições da amostra padrão, e é como base nesta que se determina a quantidade desconhecida presente numa amostra.

No método da curva-padrão é recomendado amplificar em paralelo, para cada amostra, um controlo endógeno, ou seja, um gene cujo nível de expressão é constante em todas as amostras em estudo e cuja expressão não é afectada pelo tratamento experimental. Este controlo endógeno é utilizado para corrigir variações na quantidade de RNA em cada amostra, e nas eficiências das reacções de transcrição reversa e PCR. Assim, é utilizado como controlo endógeno um gene *housekeeping* (um gene que é expresso de forma ubíqua nas células e tecidos), para o qual também é construída uma curva-padrão. A quantidade de ácido nucleico alvo é normalizada, dividindo a quantidade obtida para o gene em estudo, pela quantidade de referência endógena (Ct/quantidade). Os valores de expressão relativa obtêm-se, dividindo o valor normalizado para cada amostra, pelo valor normalizado do calibrador.

Neste trabalho, utilizou-se o qRT-PCR para quantificar os níveis de expressão do gene *C8orf48* em células TPC-1 transfectadas de forma transiente com os plasmídeos: pcDNA3NeoMyc-C8ORF48 WT, pcDNA3NeoMyc-C8ORF48 MUT e pcDNA3NeoMyc sem o gene *C8orf48* (“vazio”) (ver ponto 13 desta secção). O gene *PGK1* foi utilizado como gene *housekeeping*. Para quantificação da expressão do gene *C8orf48* nas células TPC-1 com expressão transiente de diferentes plasmídeos por qRT-PCR realizaram-se duplicados. Amplificou-se ainda, uma amostra de DNA independente (controlo) que expressava tanto o gene *C8orf48* como o gene *PGK1*. Para cada gene em estudo foi incluído um controlo negativo, sem cDNA. As amplificações por qRT-PCR foram realizadas numa placa de 384 poços (*LightCycler® 480 Multiwell Plates 384, Roche Applied Science, Alemanha*).

As reacções de *SYBR Green* foram executadas seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (*Roche Applied Science*), com algumas alterações. Inicialmente, preparou-se uma diluição de 1:5 do cDNA de cada amostra com água bidestilada estéril e uma diluição de 1:3 do DNA utilizado como controlo. Para cada amostra preparou-se, em gelo, a seguinte reacção: 3 µl da diluição do cDNA da amostra (ou do DNA utilizado como controlo), 0,5 µl de *primer forward* e de *primer reverse* (10 pmol/ µl, *Sigma-Aldrich*) e 4 µl de *LightCycler® 480 SYBR Green I Master*, 2x concentrada (que contém o fluoróforo *SYBR Green I*, dNTPs, *FastStart Taq DNA Polimerase*, tampão da reacção e $MgCl_2$; *Roche Applied Science*). As reacções de qRT-PCR foram iniciadas com uma desnaturação a 95°C, durante 10 minutos, que foi seguida de 45 ciclos de amplificação. Cada ciclo incluiu: um passo de desnaturação a 95°C durante 15 segundos, um passo de hibridação dos *primers* a 57°C durante 20 segundos e um passo de extensão dos *primers* a 72°C durante 15 segundos. O PCR quantitativo em tempo real foi realizado no *LightCycler® 480 Instrument II* (*Roche Applied Science*) e a análise dos resultados foi realizada utilizando o *software LightCycler® 480 SW 1.5* (*Roche Applied Science*).

9. Electroforese dos produtos de PCR em gel de agarose

A electroforese em gel de agarose permite separar fragmentos de DNA de acordo com o seu peso molecular. Esta técnica foi utilizada para determinar se a amplificação de cada fragmento de DNA tinha sido bem sucedida e ainda para avaliar, no caso das hidrólises com enzimas de restrição, se o produto obtido tinha sido o pretendido. Utilizou-se géis de agarose de 2% (p/v) para se separar fragmentos de DNA lineares com um peso molecular entre 100-600 pares de bases (bp), e para se separar fragmentos de DNA com um peso molecular superior utilizou-se géis de agarose de 1% (p/v).

Para a preparação dos géis de agarose, dissolveu-se a agarose numa solução tamponada de TBE 1x concentrada a pH 8,0 (89 mM Tris-base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,0) e aqueceu-se a mistura até a agarose estar completamente dissolvida, posteriormente, arrefeceu-se esta solução e adicionou-se brometo de etídeo (concentração final de 0,5 µg/ml). De seguida, verteu-se a mistura num molde contendo os pentes previamente colocados para definir o número de poços pretendidos no gel. Aguardou-se cerca de 20 minutos, por forma a ocorrer a polimerização do gel de agarose, e terminado este tempo, depositou-se o gel numa tina de electroforese horizontal, contendo uma solução tamponada de TBE 1x concentrada a pH 8,0.

De seguida, aplicaram-se as amostras de DNA e um marcador de peso molecular nos poços do gel. Este marcador é necessário para estimar o tamanho dos fragmentos de DNA. De acordo com o número de pares de bases do produto esperado, utilizou-se o marcador pUC 8 (permite determinar o peso molecular de fragmentos de DNA com um tamanho inferior a 1000 bp) (*Fermentas*, EUA) ou o marcador Lambda DNA/ HindIII (permite determinar o peso molecular

de fragmentos de DNA com um tamanho inferior ou igual a 23130 bp) (*Fermentas*). A cada uma das amostras de DNA (volume de 5 µl) juntou-se 1 µl da solução de deposição (*DNA Loading Dye 6x; Fermentas*). As electroforeses foram realizadas sob uma diferença de potencial constante de 140 V, durante aproximadamente 40 minutos. Quando se tratou da separação de fragmentos de DNA com elevado peso molecular, utilizou-se uma diferença de potencial de 117 V durante cerca de 60 minutos.

Após a electroforese, colocou-se o gel de agarose num transiluminador acoplado a uma câmara de vídeo e a um sistema informático (*BioDocAnalyze, Biometra, Alemanha*), onde este foi exposto a radiação UV (300 nm) para a visualização e exposição fotográfica das bandas de DNA.

10. Sequenciação automática

A sequenciação automática é um método que se baseia na sequenciação de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). O método de Sanger permite determinar a sequência exacta de fragmentos de DNA (Lodish *et al.*, 2004). Este método consiste na síntese de cadeias de DNA, que possuem nucleótidos marcados numa das extremidades e que diferem entre si por um nucleótido, a partir de um fragmento de DNA a ser sequenciado (Lodish *et al.*, 2004). A síntese das cadeias truncadas é conseguida pelo uso de 2',3'-didesoxinucleótidos trifosfatos (ddNTPs) marcados com fluorescência. Estas moléculas são semelhantes aos desoxinucleótidos normais (dNTPs), mas distinguem-se destes por não apresentarem um grupo hidroxilo no carbono 3'. Assim, os ddNTPs podem ser incorporados na cadeia de DNA que se encontra em síntese pela DNA polimerase mas não podem formar uma ligação fosfodiéster com outro nucleótido trifosfatado, pelo que a sua incorporação resulta na formação de uma cadeia truncada (devido à terminação prematura da síntese da cadeia) (Lodish *et al.*, 2004).

Os fragmentos de DNA sintetizados são separados de acordo com o seu tamanho por electroforese capilar. A inclusão de marcadores fluorescentes de diferentes cores em cada um dos ddNTPs permite distinguir as cadeias de DNA truncadas pela respectiva fluorescência (Lodish *et al.*, 2004). Durante a separação electroforética dos fragmentos, à medida que o DNA é atingido por um feixe de laser, o sinal correspondente a cada ddNTP vai sendo detectado (no detector de fluorescência), o que permite identificar toda a sequência de bases. Por último, a partir da análise computacional dos electroferogramas obtidos é possível determinar a sequência do DNA *template* (Figura II.3).

Neste trabalho foi utilizada a “sequenciação por amplificação linear”. Este método de sequenciação utiliza uma polimerase de DNA termoestável e ciclos de temperaturas de desnaturação, hibridação e síntese de cadeias de DNA, na presença de apenas um dos *primers* (*forward* ou *reverse*), de dNTPs e de ddNTPs marcados com fluorocromos.

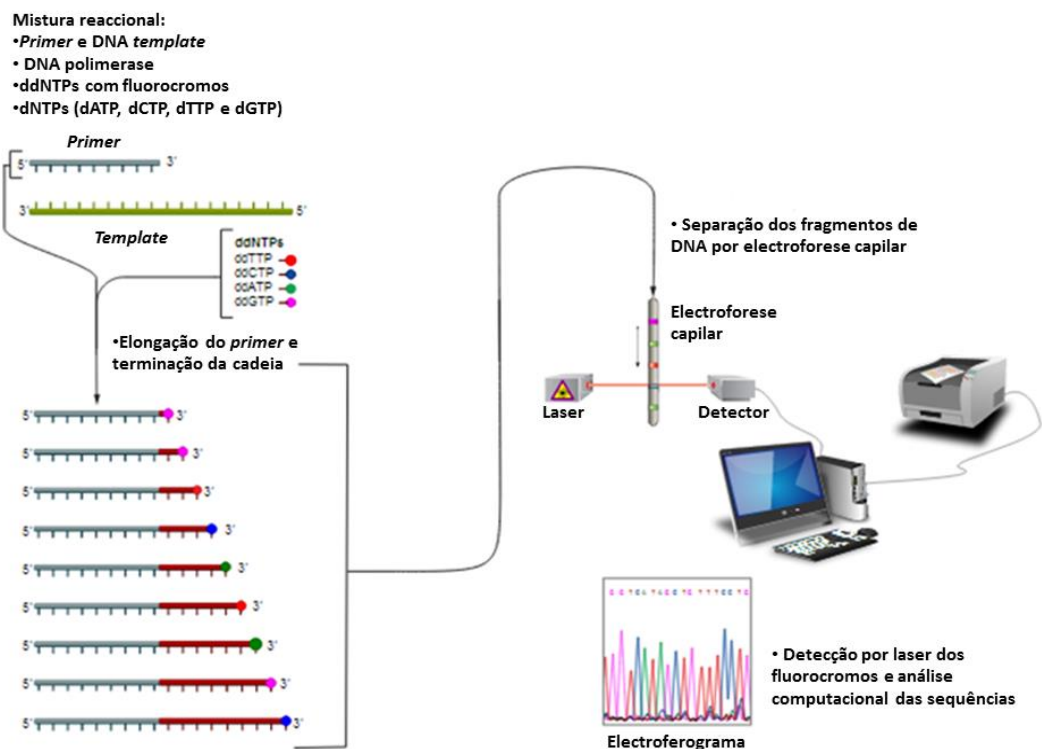


Figura II.3 - Esquema representativo da sequencição automática (adaptado de <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b2/Sanger-sequencing.svg>).

A preparação das amostras para sequencição encontra-se dividida em quatro passos: 1) purificação dos produtos de PCR; 2) reacções de sequencição; 3) precipitação dos produtos de sequencição e 4) ressuspensão das amostras.

10.1 Purificação dos produtos de PCR

Antes de se realizar a sequencição dos produtos de PCR é necessário purificá-los, por forma a eliminar *primers* em excesso e outros reagentes que possam interferir com as reacções de sequencição.

A purificação dos produtos de PCR pode ser realizada utilizando directamente os produtos em solução ou, no caso de se observar a existência de bandas inespecíficas, através da excisão da banda de DNA pretendida a partir do gel de agarose.

Nos casos em que não existiam bandas inespecíficas, utilizou-se uma mistura de duas enzimas: 10 U de *Exo I* (*Exonuclease I*) (*Thermo Scientific*, EUA) e 1 U de *FastAP* (*Thermosensitive Alkaline Phosphatase*) (*Thermo Scientific*) por cada 10 µl de produto de PCR. A enzima *Exo I* degrada o DNA em cadeia simples e a enzima *FastAP* catalisa a remoção dos grupos fosfato do DNA. Incubou-se as misturas reaccionais (produtos de PCR com as enzimas) no termociclador (*T3 thermocycler*, *Biometra*, Alemanha) a 37°C durante 15 minutos, e de seguida, inactivou-se as enzimas a 85°C durante 15 minutos.

Quando se observou no gel de agarose a existência de bandas inespecíficas, realizou-se a excisão das bandas de DNA de interesse e a sua posterior purificação utilizando o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Bioscience, GE Healthcare, EUA). Adicionou-se 510 µl de solução de captura (*capture buffer*) ao tubo contendo o fragmento excisado. Incubou-se o tubo a 60°C e realizou-se a agitação deste no vortex em intervalos de 2 minutos, para ajudar na dissolução da banda. Posteriormente, fez-se o *spin down* do tubo e colocou-se uma coluna GFX num tubo colector. Transferiu-se a amostra para a coluna GFX e incubou-se à temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugou-se o tubo a 14000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) durante 30 segundos e desprezou-se o eluído do tubo colector. Adicionou-se 500 µl de solução de lavagem (*wash buffer*) à coluna e centrifugou-se o tubo a 14000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) durante 30 segundos. Descartou-se o tubo colector e transferiu-se a coluna GFX para um novo tubo de 1,5 ml. De seguida, aplicou-se entre 30-50 µl de solução de eluição (*elution buffer*) e incubou-se o tubo à temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugou-se o tubo a 14000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) durante 1 minuto para recuperar o DNA purificado. Por último, aplicou-se o produto purificado num gel de agarose para quantificação visual da sua intensidade e armazenou-se a -20°C.

10.2 Reacções de sequenciação

Para a realização das reacções de sequenciação seguiu-se o protocolo *ABI PRISM BigDye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems, EUA). Para cada amostra preparou-se, em gelo, a seguinte mistura reaccional: 10 ng de produto de PCR purificado (ou mais, dependendo do rendimento da reacção de PCR), 3,2 pmol de um *primer* (*forward* ou *reverse*), uma solução tamponada *BigDye® Terminator v.11 and v3.1 Sequencing Buffer* (1x), 1,0 µl de *Big Dye* (ou 4,0 µl, no caso de se tratar da sequenciação de DNA plasmídico) e água destilada para perfazer o volume final de 20 µl.

De seguida, colocou-se os tubos contendo as misturas reaccionais num termociclador (*T3 thermocycler*, Biometra, Alemanha). As reacções de sequenciação decorreram em 25 ciclos. Antes do começo dos ciclos realizou-se uma desnaturação inicial a 96°C durante 3 minutos. Cada ciclo de amplificação incluiu um passo de desnaturação a 96°C durante 10 segundos, um passo de hibridação do *primer* a 50°C durante 5 segundos, e um passo de extensão a 60°C durante 4 minutos. Por fim, armazenou-se os produtos das reacções de sequenciação a 4°C até posterior utilização.

10.3 Precipitação dos produtos de sequenciação

É necessário purificar os produtos das reacções de sequenciação antes de se efectuar a electroforese capilar, para remover os ddNTPs marcados não-incorporados. Assim, realizou-se a purificação dos produtos das reacções de sequenciação através da precipitação com etanol/

EDTA/ acetato de sódio, conforme recomendado pelo protocolo do *BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)*.

Para cada reacção de precipitação, juntou-se num tubo de 1,5 ml: 2 µl de acetato de sódio 3mM, pH 4,6; 2 µl de EDTA 125 mM, pH 8,0 e 50 µl de etanol absoluto. O EDTA inibe a acção da enzima utilizada na reacção de sequenciação, enquanto que o etanol absoluto e o acetato de sódio reduzem a solubilidade dos ácidos nucleicos, levando à sua precipitação. De seguida, adicionou-se a este tubo o produto da reacção de sequenciação e homogeneizou-se através da agitação no vortex. Incubou-se o tubo à temperatura ambiente durante 15 minutos, e após esta incubação centrifugou-se a solução a 14000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5810R*), durante 40 minutos, a 4°C.

Posteriormente, removeu-se completamente o sobrenadante, adicionou-se ao tubo 190 µl de etanol a 70% e agitou-se o tubo ligeiramente no vortex. O etanol a 70% é utilizado para remover sais. Seguidamente, centrifugou-se o tubo a 14000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5810R*), durante 15 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, removeu-se completamente o sobrenadante e secou-se o *pellet* a 37°C, durante 5 minutos. Por último, armazenou-se o *pellet* de DNA a 4°C.

10.4 Electroforese capilar dos produtos de sequenciação

Para determinar a sequência nucleotídica das amostras, ressuspendeu-se os *pellets* de DNA em 15 µl de formamida Hi-Di (*Applied Biosystems*), agitou-se no vortex e distribuiu-se as amostras por uma placa de 96 poços (*Platemax, Axygen, EUA*). Colou-se uma película transparente por cima da placa e realizou-se a desnaturação das amostras a 95°C, durante 10 minutos.

Após a desnaturação, colocou-se a placa no gelo durante 5 minutos e centrifugou-se a 1200 rpm (*eppendorf Centrifuge 5810R*), durante 2 minutos. Por fim, colocou-se a placa no sequenciador automático *ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*. No sequenciador, cada amostra foi submetida a uma electroforese capilar durante cerca de 30 minutos.

As sequências de DNA de cada uma das amostras foram obtidas utilizando o programa *Sequencing Analysis 3.4.1 (Applied Biosystems)*. Este programa converte os sinais de fluorescência em electroferogramas. Posteriormente, realizou-se a análise das sequências de DNA obtidas com o programa *Variant reporter v.1.0 (Applied Biosystems)*.

11. Preparação dos plasmídeos pcDNA3Neomyc-C8ORF48 WT e pcDNA3Neomyc-C8ORF48 MUT

11.1 Preparação do plasmídeo pcDNA3NeoMyc

Para amplificar o plasmídeo pcDNA3NeoMyc (gentilmente fornecido pelo Doutor Paulo Matos, Departamento de Genética, Instituto Ricardo Jorge) (Figura II.4), numa primeira etapa, introduziu-se este plasmídeo em bactérias competentes (transformação). Posteriormente, as bactérias foram propagadas num meio de cultura sólido, para se obterem colónias. De seguida, transferiu-se uma das colónias obtidas, para um meio de cultura líquido, onde foi propagada. Por fim, extraiu-se e purificou-se o DNA plasmídico das bactérias, através de *minipreps* (em pequena escala) e *maxipreps* (em grande escala).

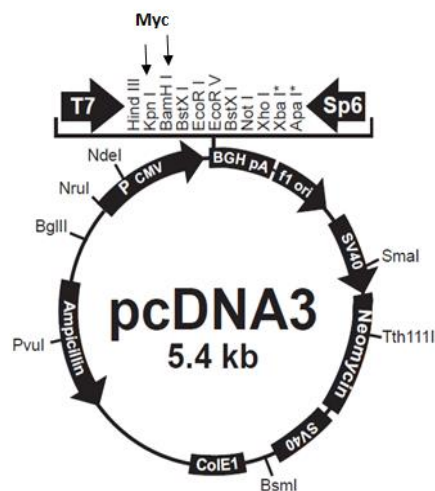


Figura II. 4 - Representação do plasmídeo pcDNA3NeoMyc (adaptado de <http://www.molecularinfo.com/MTM/K/K2/K2-1/pcdna3.pdf>)

11.1.1 Transformação de bactérias quimicamente competentes

A transformação bacteriana consiste na introdução de um plasmídeo numa bactéria. Na transformação realizada, utilizou-se bactérias *Escherichia Coli* TOP 10 (50µl/ tubo *stock*) do *Kit One Shot TOP 10 (Invitrogen™)*. Primeiramente, descongelou-se em gelo uma ampola de 50 µl de células competentes. Adicionou-se 0,1 µl de plasmídeo pcDNA3NeoMyc a 12,5 µl de células competentes. Agitou-se o tubo e incubou-se no gelo durante 30 minutos. Após a incubação em gelo, colocou-se o tubo a 42°C, durante 45 segundos e depois novamente em gelo, durante 2 minutos. Desta forma, gerou-se um choque térmico que permitiu a entrada de DNA plasmídico nas células bacterianas. De seguida, adicionou-se à mistura reaccional 200 µl de meio S.O.C. (*Invitrogen™*) e colocou-se o tubo no agitador orbital a 37°C, durante 1 hora, com agitação de 220 rpm (*Gallenkamp Orbital Incubator, Sanyo, Reino Unido*).

Depois da incubação a 37°C com agitação, depositou-se 25 µl da suspensão bacteriana numa placa de LB-agar (com uma concentração final de ampicilina de 100 µg/ml), e espalhou-se este inóculo. Colocou-se a placa invertida na estufa a 37°C, *overnight*. O plasmídeo pcDNA3NeoMyc possui um gene que confere resistência à ampicilina (o gene *AmpR*), assim sendo, na placa de LB-agar (contendo ampicilina) só seria esperado crescerem as bactérias que possuíssem este gene, ou seja, aquelas que tinham sido transformadas.

Após o crescimento de colónias bacterianas na placa de LB-agar, picou-se ao de leve, com uma ponta de micropipeta descartável, uma colónia. Colocou-se esta colónia num tubo de 50 ml, contendo 6 ml de meio LB (*Lysogeny broth*) e 24 µl de ampicilina (com uma concentração

final de 100 µg/ml). Por último, incubou-se a cultura bacteriana no agitador orbital a 37°C, com agitação de 200 rpm, *overnight* (Gallenkamp Orbital Incubator, Sanyo).

11.1.2 Extracção e purificação do DNA plasmídico em pequena escala (*minipreps*)

Após o crescimento das bactérias em meio LB líquido, realizou-se a extracção e a purificação do DNA plasmídico, utilizando para tal, o *Plasmid DNA Minipreps Kit* (Citomed, Portugal). O protocolo realizado foi o seguinte:

Centrifugou-se o tubo de 50 ml, contendo a cultura bacteriana, a 4000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5810R*), durante 10 minutos, a 20°C. Descartou-se o sobrenadante e soltou-se o *pellet*. Posteriormente, adicionou-se ao tubo 300 µl da solução I, homogeneizou-se, e incubou-se o tubo à temperatura ambiente, durante 1 minuto. De seguida, distribuiu-se 100 µl do conteúdo do tubo por 3 tubos de 1,5 ml e adicionou-se a estes 200 µl da solução II, misturou-se o conteúdo dos tubos por inversão (4-6 vezes) e incubou-se à temperatura ambiente, durante 1 minuto. Adicionou-se 350 µl da solução III e homogeneizou-se as misturas, gentilmente. Incubaram-se os tubos à temperatura ambiente, durante 1 minuto.

Seguidamente, centrifugaram-se os tubos a 12000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) durante 5 minutos. Após a centrifugação, transferiu-se o sobrenadante de cada tubo para uma coluna *EasySpin*. Centrifugaram-se os tubos colectores (contendo as colunas *EasySpin*) a 10000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*), durante 2 minutos. Descartaram-se as soluções eluídas, adicionou-se 500 µl da solução de lavagem (*Wash solution*) às colunas e centrifugaram-se a 10000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*), durante 2 minutos (repetiu-se este passo duas vezes). Descartaram-se, novamente, as soluções eluídas e centrifugaram-se os tubos a 10000 rpm durante mais um minuto, para remover qualquer resíduo da solução de lavagem. Transferiram-se as colunas para tubos de 1,5 ml, adicionou-se 50 µl de água a 60°C às colunas, e incubaram-se à temperatura ambiente, durante 2 minutos. Centrifugaram-se os tubos a 10000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*), durante 2 minutos e recolheram-se as soluções eluídas. Por fim, quantificou-se a concentração de DNA plasmídico purificado por espectrofotometria e armazenou-se a -20°C.

11.1.3 Preparação do DNA plasmídico em larga escala (*maxipreps*)

Por forma a obter uma grande quantidade de DNA plasmídico (300 µg - 500 µg), realizou-se a preparação de *maxipreps*, utilizando o *Qiagen Plasmid MaxiKits* (QIAGEN). O protocolo realizado foi o seguinte:

Primeiramente, juntou-se 200 µl da cultura bacteriana inicial utilizada para a realização das *minipreps* a 100 ml de meio LB e 1 ml de ampicilina com a concentração de 10 mg/ml (concentração final de 100 µg/ml). Colocou-se o frasco, contendo a cultura bacteriana a 37°C, com agitação de 200 rpm, *overnight* (Gallenkamp Orbital Incubator, Sanyo).

No dia seguinte, transferiu-se a cultura bacteriana para um frasco de 250 ml (*Sorvall, GMI Inc.*, EUA). Centrifugou-se o frasco a 5980 rpm utilizando o rotor GSA (*Sorvall RC-5C, Biotech, GMI Inc.*, raio do rotor = 155 mm) durante 15 minutos, a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* bacteriano em 10 ml do tampão de ressuspensão (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM e RNase A 100 µg/ml). De seguida, transferiu-se a solução para um tubo *Sorvall* de 50 ml, adicionou-se 10 ml da solução de lise, constituída por NaOH 200 mM e SDS 1% (p/v), homogeneizou-se o conteúdo do tubo e incubou-se à temperatura ambiente, durante 5 minutos. Adicionou-se 10 ml de tampão de neutralização (acetato de potássio 3,0 M, pH 5,5), homogeneizou-se a solução pela inversão do tubo (4-6 vezes) e incubou-se no gelo durante 20 minutos. Centrifugou-se o tubo a 12940 rpm, utilizando o rotor SS-34 (*Sorvall RC-5C, Biotech, GMI Inc.*, raio do rotor = 115 mm) durante 30 minutos, a 4°C. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo *Sorvall* de 50 ml. Centrifugou-se este tubo a 12940 rpm (*Sorvall RC-5C/rotor SS-34*) durante 15 minutos, a 4°C.

Equilibrou-se uma coluna QIAGEN (Tip 500) pela aplicação de 10 ml de tampão QBT [NaCl 750 mM; MOPS 50 mM, pH 7,0; isopropanol 15% (v/v) e Triton X-100 0,15% (v/v)]. Após a eluição do tampão QBT, adicionou-se à coluna o sobrenadante contendo o DNA plasmídico. Lavou-se a coluna QIAGEN duas vezes com 30 ml de tampão de lavagem, e eluiu-se o DNA plasmídico com 15 ml de tampão de eluição para um tubo *Corex* de 30 ml. Precipitou-se o DNA através da adição de 10,5 ml de isopropanol e homogeneizou-se a solução. Centrifugou-se os tubos (previamente colocados nos adaptadores) a 11240 rpm (*Sorvall RC-5C/rotor SS-34*) durante 30 minutos, a 4°C. Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 5 ml de etanol a 70% (v/v) ao *pellet* de DNA e centrifugou-se o tubo a 11240 rpm (*Sorvall RC-5C/rotor SS-34*), durante 10 minutos, a 4°C. Removeu-se o sobrenadante, cuidadosamente, para não perturbar o *pellet*. Secou-se o *pellet* ao ar e ressuspendeu-se em 200 µl de água bidestilada estéril. Transferiu-se a solução contendo o DNA plasmídico para um tubo de 1,5 ml, quantificou-se a concentração de DNA obtida espectrofotometricamente e armazenou-se a -20°C. Para confirmar a sequência do plasmídeo pcDNA3NeoMyc, realizou-se a sequenciação do DNA resultante de uma das *maxipreps* com os *primers* pCMV e pGMR (estes *primers* amplificam a região do plasmídeo onde é inserido o *insert*).

11.2 Amplificação do insert *C8orf48*

A amplificação do gene *C8orf48* foi realizada por PCR, para tal, desenharam-se *primers* específicos (as sequências encontram-se descritas na tabela III dos anexos) em que se inseriu “caudas”, para que as extremidades do *insert* fossem compatíveis com as extremidades do plasmídeo no qual este seria inserido (o plasmídeo pcDNA3NeoMyc). Posteriormente, realizou-se a purificação do *insert* com o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (*Amersham Bioscience, GE Healthcare*). Neste caso, purificou-se todo o produto obtido, e a eluição deste foi

realizada com 30 µl de água bidestilada estéril a 65°C. De seguida, analisou-se o produto purificado por electroforese em gel de agarose de 1% (p/v).

11.3 Hidrólise do insert *C8orf48* e do plasmídeo pcDNA3NeoMyc

Após a purificação do *insert C8orf48* e do plasmídeo pcDNA3NeoMyc (resultante das *maxipreps*) realizou-se a hidrólise de ambos, utilizando para tal duas enzimas, a *EcoRI* e a *BamHI*. Para a hidrólise do plasmídeo pcDNA3NeoMyc com a enzima *EcoRI*, realizou-se uma reacção em que se juntou num tubo de 0,2 ml: 3 µg de DNA plasmídico, solução tamponada NE *buffer* 3 (1x concentrada; *New England BioLabs*, Reino Unido), 8 U da enzima *EcoRI* (*New England BioLabs*) e água bidestilada estéril para perfazer o volume final de 80 µl. Para a hidrólise do *insert C8orf48* utilizou-se 14 µl do *insert*, 14 U da enzima *EcoRI* (*New England BioLabs*) e os restantes reagentes foram iguais aos utilizados na hidrólise do plasmídeo, diferindo o volume final, que neste caso foi de 70 µl. De seguida, incubou-se as misturas reaccionais a 37°C, durante 2 horas (*T3 thermocycler*, *Biometra*). Após esta incubação, inactivou-se a enzima *EcoRI* a 65°C, durante 20 minutos (*T3 thermocycler*, *Biometra*).

Posteriormente, realizou-se a hidrólise do *insert* e do plasmídeo com a enzima *BamHI*. Para a hidrólise de ambos, juntou-se 70 µl do produto da reacção de hidrólise com a enzima *EcoRI*, solução tamponada NE *buffer* 3 (1x concentrada; *New England BioLabs*), BSA (concentração final de 100 µg/ml) (1x concentrada; *New England Biolabs*), 20 U da enzima *BamHI* (*New England BioLabs*) e água bidestilada estéril para perfazer o volume final de 90 µl. Incubou-se as misturas reaccionais a 37°C, *overnight* (*T3 thermocycler*, *Biometra*).

De seguida, os produtos das reacções de hidrólise foram analisados por electroforese em gel de agarose de 1% (p/v). Após a electroforese, realizou-se a purificação do *insert C8orf48* e do plasmídeo pcDNA3NeoMyc com o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (*Amersham Bioscience*, *GE Healthcare*). Na purificação de ambos utilizou-se todo o produto obtido, e a eluição destes foi realizada com 30 µl de água bidestilada estéril a 65°C. Por último, aplicou-se as amostras purificadas num gel de agarose de 1% (p/v), para quantificação visual da sua intensidade.

11.4 Preparação do plasmídeo pcDNA3NeoMyc-C8ORF48 WT (*Wild type*)

Por forma a introduzir o *insert C8orf48* no plasmídeo pcDNA3NeoMyc realizou-se uma reacção de ligação. Para tal, juntou-se num tubo de 0,2 ml (em gelo): 2 µl do vector pcDNA3NeoMyc hidrolisado pelas enzimas *BamHI* e *EcoRI*, 10 µl do *insert C8orf48* hidrolisado pelas mesmas enzimas, solução tamponada T4 DNA ligase *buffer* (1x concentrada; *Fermentas*), 1 µl da enzima T4 DNA ligase (1000 CEU/µl; *Fermentas*) e água bidestilada estéril para perfazer o volume final de 20 µl. Incubou-se a mistura reaccional a 15°C, *overnight* (*T3 thermocycler*, *Biometra*).

No dia seguinte, procedeu-se à transformação de bactérias competentes *Escherichia Coli* TOP 10 (50µl/ tubo *stock*) com o plasmídeo resultante da reacção de ligação. Adicionou-se, em gelo, num tubo de 1,5 ml: 5 µl da reacção de ligação a 50 µl de células competentes. Noutro tubo (controlo), juntou-se 2 µl do plasmídeo pcDNA3NeoMyc “vazio” com 40 µl de células competentes, posteriormente, seguiu-se o protocolo de transformação de células competentes, descrito no ponto 11.1.1 desta secção. No final, inocularam-se 2 placas com células transformadas com o plasmídeo resultante da reacção de ligação e 1 placa (controlo) com células transformadas com o plasmídeo vazio. Inoculou-se ainda uma placa (controlo) com 10 µl de células não transformadas.

Após o crescimento de colónias nas placas de LB-agar, seleccionou-se um total de 6 colónias nas duas placas que possuíam células transformadas com o plasmídeo resultante da reacção de ligação. Picou-se ao de leve, com uma ponta de micropipeta descartável, as colónias pretendidas. Colocou-se cada colónia individual num tubo de 50 ml, contendo 3 ml de meio LB e 12 µl de ampicilina (com uma concentração final de 100 µg/ml). Incubaram-se as culturas bacterianas no agitador orbital a 37°C, com agitação de 200 rpm, *overnight* (Gallenkamp Orbital Incubator, Sanyo).

Após o crescimento de bactérias em meio LB líquido, realizou-se a extracção e a purificação do seu DNA plasmídico, utilizando o *Plasmid DNA Minipreps Kit* (Citomed). O protocolo de preparação de *minipreps* realizado foi o mesmo que o descrito no ponto 11.1.2 desta secção. O DNA plasmídico obtido a partir de cada uma das *minipreps* foi quantificado por espectrofotometria e armazenado a -20°C.

Por último, para confirmar que o *insert C8orf48* se encontrava inserido no plasmídeo pcDNA3NeoMyc amplificou-se o DNA plasmídico (obtido a partir de cada *miniprep*) por PCR com os *primers* pCMV e pGMR (estes *primers* flanqueiam a região em que se inseriu o *insert*), e aplicou-se os produtos num gel de agarose de 1% (p/v). Posteriormente, realizou-se a sequenciação de duas das *minipreps*, da região do DNA plasmídico em que se insere o *insert*, com os *primers* pCMV e pGMR.

11.5 Preparação do plasmídeo pcDNA3NeoMyc-C8ORF48 MUT (Mutante)

A variante c.65C>T identificada no gene *C8orf48*, que é esperado resultar na substituição de um resíduo treonina por um resíduo isoleucina no codão 22 (p.T22I), foi introduzida no plasmídeo pcDNA3NeoMyc-C8ORF48 WT por mutagénese dirigida. Para tal, desenharam-se *primers* específicos (as sequências encontram-se descritas na tabela IV dos anexos), utilizando a fórmula $T_m = 81,5 + 0,41 (\% \text{ GC}) - 675/N - \% \text{ mismatch}$, em que T_m é a temperatura de *melting*; % GC é a percentagem de guanina e de citosina dos *primers*; N é o número de bp dos *primers* e a % *mismatch* é a percentagem de mutações existentes. Ambos os *primers* devem conter a mutação que se pretende inserir, devem possuir entre 25 a 45 bp de tamanho e a $T_m \geq$

78°C, para além disso, os *primers* devem possuir um conteúdo mínimo de GC de 40%, a mutação deve estar no centro dos *primers*, e estes devem terminar em uma ou mais bases de guanina ou citosina.

Para a reacção de mutagénese utilizou-se o *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies, EUA), e realizou-se o protocolo seguinte:

Testou-se 3 condições diferentes para a mutagénese. Numa das reacções utilizou-se 25 ng de DNA plasmídico (resultante de uma das *minipreps*), noutra reacção, utilizou-se 50 ng e numa terceira reacção, utilizou-se 25 ng de DNA plasmídico com DMSO (dimetilsulfóxido; Sigma-Aldrich) a 2% (v/v). Em todas as reacções, adicionou-se ao DNA plasmídico, 125 ng de *primers forward* e *reverse* com a mutação pretendida (Sigma-Aldrich), 1 µl de dNTP mix (Agilent Technologies), tampão da reacção (1x concentrado; Agilent Technologies), 2,5 U de *Pfu Turbo DNA polymerase* (Stratagene, EUA) e água bidestilada estéril para perfazer o volume final de 50 µl. Colocou-se as misturas reaccionais num termociclador (Biometra). As condições utilizadas para a amplificação por PCR foram as seguintes: uma desnaturação inicial do DNA a 95°C durante 30 segundos. Seguindo-se 16 ciclos de amplificação. Cada ciclo incluiu um passo de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, um passo de hibridação dos *primers* a 60°C durante 1 minuto, e um passo de extensão a 68°C durante 12 minutos.

Após a amplificação por PCR, armazenou-se os produtos obtidos a 4°C. Posteriormente, aplicou-se 10 µl dos produtos num gel de agarose de 1% (p/v), para averiguar se a amplificação por PCR tinha ocorrido com sucesso.

De seguida, adicionou-se ao restante produto 1 µl da enzima de restrição *Dpn I* (10 U/µl) (Agilent Technologies). A *DpnI* é uma endonuclease, que é específica para o DNA metilado e hemimetilado, e é utilizada para digerir o DNA *template* parental (que se encontra metilado) e para seleccionar o DNA sintetizado que contém a mutação (pois este não se encontra metilado). Homogeneizaram-se as misturas gentilmente (fazendo *up and down* com a pipeta). Realizou-se o *spin down* de cada tubo, e incubou-se a 37°C durante 1 hora (Biometra), para digerir o DNA parental superenrolado. Após a digestão, analisaram-se os produtos obtidos por electroforese em gel de agarose de 1% (p/v).

Seguidamente, realizou-se a transformação de bactérias competentes *Escherichia Coli* TOP 10 (50µl/ tubo *stock*) com o plasmídeo pcDNA3NeoMyc-C8ORF48 MUT. Adicionou-se, em gelo, num tubo de 1,5 ml: 2,5 µl da reacção contendo 50 ng de DNA plasmídico a 50 µl de células competentes. Noutro tubo, juntou-se 2,5 µl da reacção contendo 25 ng de DNA plasmídico e DMSO 2% (v/v) com 50 µl de células competentes. Seguiu-se o protocolo de transformação de células competentes, descrito no ponto 11.1.1 desta secção. No final, inocularam-se 2 placas de LB-agar com células transformadas com 50 ng de DNA plasmídico, e 2 placas com células transformadas com 25 ng de DNA plasmídico (e DMSO).

Após o crescimento de colónias nas placas de LB-agar, seleccionou-se um total de 10 colónias (6 colónias da placa contendo células transformadas com 50 ng de DNA plasmídico e 4 colónias da placa contendo células transformadas com 25 ng de DNA plasmídico e DMSO). Picou-se ao de leve, com uma ponta de micropipeta descartável, as colónias pretendidas. Colocou-se cada colónia individual num tubo de 50 ml, contendo 3 ml de meio LB e 12 µl de ampicilina (com uma concentração final de 100 µg/ml). Incubou-se as culturas bacterianas no agitador orbital a 37°C, com agitação de 200 rpm, *overnight* (Gallenkamp Orbital Incubator, Sanyo).

Após o crescimento de bactérias em meio LB líquido, realizou-se a preparação de *minipreps*, utilizando o *Plasmid DNA Minipreps Kit* (Citomed). O protocolo utilizado foi o mesmo que o descrito no ponto 11.1.2 desta secção. O DNA plasmídico obtido a partir de cada uma das *minipreps* foi quantificado por espectrofotometria e armazenado a -20°C.

Para confirmar que os plasmídeos obtidos continham a mutação c.65C>T no *insert*, realizou-se a sequenciação do DNA plasmídico resultante de cada uma das *minipreps* com os *primers* T7 e BGH (estes *primers* flanqueiam a região onde se inseriu o *insert*; os *primers* pCMV e pGMR não foram utilizados porque o seu *stock* se esgotou).

11.6 Preparação do plasmídeo pcDNA3NeoMyc-C8ORF48 WT e do plasmídeo pcDNA3NeoMyc-C8ORF48 MUT em larga escala (*maxiprep*)

Por fim, para se obter uma grande quantidade de DNA plasmídico *wild type* e mutante (300 µg - 500 µg), realizou-se a preparação de *maxipreps*, utilizando para tal, o *Qiagen Plasmid MaxiKits* (QIAGEN). O protocolo realizado foi o mesmo que o descrito no ponto 11.1.3 desta secção, no entanto, neste caso utilizou-se dois frascos. Num dos frascos, juntou-se 100 ml de meio LB e 400 µl de ampicilina (concentração final de 100 µg/ml, concentração do *stock* 25 mg/ml) com 200 µl da cultura contendo bactérias transformadas com o plasmídeo pcDNA3NeoMyc-C8ORF48 WT, e no outro frasco juntou-se as mesmas quantidades de ampicilina e de meio LB com 200 µl da cultura contendo bactérias transformadas com o plasmídeo pcDNA3NeoMyc-C8ORF48 MUT.

Para confirmar a sequência dos plasmídeos *wild type* e mutante, realizou-se a sequenciação do DNA resultante de cada uma das *maxipreps* com os *primers* T7 e BGH.

12. Cultura de células

Para este estudo foi utilizada uma linha celular de células de carcinoma papilar da tiróide humano, TPC-1. O manuseamento das células foi sempre realizado num ambiente estéril, numa câmara de fluxo laminar. As células foram mantidas numa estufa (NuairéTM US Autoflow CO₂ Water-Jacketed Incubator, EUA) a 37°C em ambiente de 5% CO₂.

As células TPC-1 foram propagadas em meio de cultura RPMI, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) (*GIBCOTM*, *InvitrogenTM*, *Life Technologies*, EUA), L-glutamina 1x (*GIBCOTM*) e antibiótico-antimicótico 1x (*GIBCOTM*).

Todos os reagentes conservados a 4°C, antes de serem utilizados, foram aquecidos a 37°C, para evitar o stresse celular provocado pela diferença de temperatura. Para manter a esterilidade, os reagentes foram abertos e utilizados apenas dentro da câmara de fluxo laminar. A observação das células foi realizada através de um microscópio invertido *Axiovert 135* (*Zeiss*, Alemanha).

12.1 Descongelamento de células

As células TPC-1 foram criopreservadas numa solução de congelamento contendo FBS e DMSO (*Sigma-Aldrich*) a 10% (v/v). O DMSO é um crioprotector, e é adicionado às células para reduzir a formação de cristais de gelo, que poderiam conduzir à lise celular durante o processo de congelamento. Os criotubos foram retirados do azoto líquido e descongelados, rapidamente, com as mãos. Desrolhou-se lentamente os tubos, de modo a aliviar a pressão existente no seu interior. Retirou-se as células com uma seringa de 1 ml. Transferiu-se as células para um tubo estéril de 50 ml, contendo 25 ml de meio de cultura não suplementado, para lavar as células. Centrifugou-se o tubo durante 5 minutos a 1200 rpm (*Labofuge 400*, *Heraeus Instruments*). Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e soltou-se o *pellet*. Ressuspendeu-se as células em 5 ml de meio suplementado. De seguida, transferiu-se a suspensão celular para um frasco de cultura de 260 ml, contendo 10 ml de meio suplementado. Colocou-se o frasco na estufa a 37°C, em ambiente 5% CO₂, na posição horizontal, pois as células TPC-1 são aderentes, e com a rolha “aliviada”.

12.2 Propagação e expansão de células

As células foram propagadas em meio de cultura RPMI suplementado. O meio de cultura foi renovado a cada 3 dias, para evitar a sua saturação e a insuficiência de nutrientes.

Para a expansão celular, quando os frascos de cultura apresentavam uma confluência celular elevada (80-90%), transferiu-se as células para novos frascos, para tal, removeu-se o meio e lavou-se as células com PBS sem magnésio e sem cálcio (*Phosphate Buffared Saline* -Mg²⁺/Ca²⁺; *GIBCOTM*). O PBS é utilizado para remover resíduos de FBS, que poderiam inibir a tripsina. Adicionou-se tripsina-EDTA (*GIBCOTM*) e agitou-se suavemente o frasco de cultura, de modo a cobrir todas as células com a tripsina. De seguida, incubou-se o frasco a 37°C durante 5 minutos. A tripsina-EDTA é utilizada para dissociar as ligações entre as células TPC-1 e para dissociar estas, que são células aderentes, da superfície do frasco. Após a perda da aderência das células, a tripsina foi neutralizada pela adição de meio não suplementado. Posteriormente, transferiu-se as células para um tubo de 50 ml e centrifugou-se este a 1200 rpm, durante 5 minutos (*Labofuge 400*, *Heraeus Instruments*). Após a centrifugação, descartou-se o

sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* numa quantidade específica de meio de cultura suplementado. Transferiu-se a suspensão celular para novos frascos de cultura e colocou-se estes frascos na estufa a 37°C em ambiente 5% de CO₂, com a rolha “aliviada” para permitir as trocas gasosas.

12.3 Contagem de células

Por forma a determinar o número de células existente em suspensão, preparou-se uma diluição de 1:2 num tubo de 2 ml, para tal, juntou-se: 200 µl de suspensão celular com 160 µl de PBS (sem Mg²⁺/Ca²⁺) e 40 µl de azul de tripano (1:3) (*Biochrom AG*, Alemanha). O azul de tripano é um corante que deixa as células não viáveis com uma cor azul característica quando observadas ao microscópio, enquanto que as células viáveis não são coradas (Stoddart, 2011). As células viáveis possuem membranas intactas e não absorvem o corante do meio envolvente. Por outro lado, as células não viáveis não possuem uma membrana intacta e funcional sendo permeáveis ao azul de tripano (Stoddart, 2011). Após a entrada nas células, o azul de tripano atravessa o invólucro nuclear e fixa-se nos núcleos, que ficam corados de azul. De seguida, homogeneizou-se a mistura, colocou-se 10 µl desta num hemocitómetro (0,100 mm, *Neubauer Improved*, Alemanha) e contaram-se as células viáveis e não viáveis (coradas). As contagens foram sempre realizadas em triplicado ou em quadruplicado. O número (n.º) de células existente por ml foi determinado pela fórmula:

$$N.º \text{ células/ml} = n.º \text{ médio de células} \times 10^4 \times 2 \text{ (factor de diluição)}$$

12.4 Criopreservação de células

Transferiu-se a suspensão celular (contendo 1×10^7 células) para um tubo de 50 ml e centrifugou-se a 1200 rpm (*Labofuge 400*, *Heraeus Instruments*) durante 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* celular em 2 ml de uma solução de congelação (constituída por 1,8 ml de FBS e 200 µl de DMSO 10 % v/v). De seguida, distribuiu-se 1 ml da suspensão celular por duas ampolas de congelação. Colocou-se as ampolas a -70°C durante 1 hora e, posteriormente, armazenou-se em azoto líquido (a -180°C).

13. Transfecção de células TPC-1 com vectores derivados do pcDNA3NeoMyc

Para a transfecção transiente de células TPC-1, plaquearam-se $1,0 \times 10^5$ células TPC-1/poço, em 9 poços, de uma placa de 24. No processo de transfecção transiente, o DNA introduzido nas células não é integrado no genoma nuclear destas. Passado 24 horas após o plaqueamento, diluiu-se o DNA plasmídico (1,5 µg) num volume adequado de meio OPTI-MEM (*GIBCO™*). Posteriormente, adicionou-se ao DNA plasmídico diluído meio OPTI-MEM

para perfazer o volume final de 150 µl. Diluiu-se 3,75 µl de lipofectamina (*Lipofectamine® 2000, InvitrogenTM*) em 150 µl de OPTI-MEM e incubou-se 5 minutos à temperatura ambiente. Juntou-se o DNA diluído com a lipofectamina e misturou-se com a pipeta, incubando à temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir a formação de complexos de DNA-lipofectamina. Durante os 20 minutos, removeu-se o meio de cada um dos poços da placa de 24 poços. Lavou-se uma vez com 500 µl de meio não suplementado e juntou-se 400 µl de meio RPMI suplementado com 10% (v/v) de FBS e 1% (v/v) de glutamina, sem antibiótico. De seguida, adicionou-se 100 µl do complexo DNA-lipofectamina a cada poço, agitou-se a placa ligeiramente e incubou-se as células durante 6 horas, a 37°C, em ambiente 5% de CO₂, para ocorrer a transfecção. Após a incubação, substituiu-se o meio de cada um dos poços da placa, adicionando novo meio RPMI 10% (v/v) FBS. Por último, voltou a colocar-se a placa na estufa a 37°C, em ambiente 5% de CO₂.

14. Ensaio de viabilidade celular

Para realizar o ensaio de viabilidade celular, inicialmente, expandiram-se as células TPC-1 transfectadas com os diferentes plasmídeos para duas placas de 96 poços, de modo a obter em cada poço a confluência pretendida para este ensaio, cerca de 60%. Para tal, removeu-se o meio da placa de 24 poços (preparada no ponto 13 dos materiais e métodos) e lavou-se uma vez com 1 ml de PBS (sem Mg²⁺/Ca²⁺). De seguida, adicionou-se 50 µl de tripsina a cada poço e incubou-se a placa durante 5 minutos, a 37°C (na estufa). Adicionou-se a cada poço 1500 µl de meio RPMI suplementado com 2% (v/v) de FBS sem antibiótico, transferiu-se a suspensão celular para tubos de 2 ml e homogeneizou-se com a pipeta para separar as células. Distribuiu-se 2x100 µl de cada um dos tubos para os poços de duas placas de 96, uma das placas para o *time-point* 48 horas após a transfecção e a outra para o *time-point* 72 horas após a transfecção. Para determinar o número de células viáveis em proliferação, utilizou-se o método colorimétrico *CellTiter 96R Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega, EUA).

O *CellTiter 96R Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* é constituído pelas soluções de um composto tetrazólio, o MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio, sal interno], e por um reagente que realiza o acoplamento de electrões, o PMS (metosulfato de fenazina). O MTS é bioreduzido pelas células num produto formazano, que é solúvel no meio de cultura. A conversão do MTS em formazano é realizada por enzimas desidrogenase que existem em células metabolicamente activas. A quantidade de formazano, como medida da quantidade da absorvância a 490 nm, é directamente proporcional ao número de células viáveis existentes em cultura.

O protocolo utilizado para a determinação do número de células viáveis existente em cada um dos poços das placas de 96 foi o seguinte:

Primeiramente, juntou-se uma ampola do reagente PMS (100 µl) com uma ampola do reagente MTS (2000 µl). De seguida, adicionou-se 20 µl da mistura MTS/PMS a cada poço de uma placa de 96, contendo células transfectadas com os plasmídeos, e 100 µl de meio RPMI suplementado com 2% (v/v) de FBS. Aos controlos, em triplicado, contendo apenas 80 µl de meio RPMI suplementado com 2% (v/v) de FBS, adicionou-se 16 µl da mistura MTS/PMS por poço. Posteriormente, incubou-se as placas de 96 poços na estufa, a 37°C, em ambiente 5% de CO₂. Retirou-se as placas nos *time-points* definidos: 1, 2 e 3 horas após a incubação e mediu-se a absorvância a 490 nm de cada um dos poços no *Microplate Reader iMark* (BioRad, EUA), utilizando o *software* MPM6. Por fim, analisou-se os resultados obtidos no Microsoft Excel.

15. Análise estatística

Os dados obtidos através de vários replicados em experiências independentes foram expressos como média \pm valores desvio padrão. Para analisar os resultados do ensaio de viabilidade celular utilizou-se o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e o *post-test* de comparação múltipla de Dunn, pois os dados apresentavam diferenças significativas para as variâncias. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

Os resultados obtidos foram analisados usando o *software* estatístico *GraphPad Prism 4.0* (GraphPad Software, EUA).

III. RESULTADOS

1. Estudo do gene *DICER1* em famílias com FNMTc, FMNG, NMTC e MNG e num caso isolado de MNG associado a tumor do ovário

1.1 Famílias seleccionadas para o estudo do gene DICER1

Para o estudo do gene *DICER1*, seleccionaram-se um total de 15 famílias e um caso isolado, com lesões da tiróide. Estas famílias foram agrupadas em FNMTC (*Familial Non-Medullary Thyroid Carcinoma*), FMNG (*Familial Multinodular Goiter*) e famílias com carcinomas não-medulares da tiróide (NMTC) e bócio multinodular (MNG). As famílias com FNMTC apresentavam pelo menos dois casos de NMTC, as famílias com FMNG apresentavam pelo menos três casos de MNG e as famílias com NMTC/MNG apresentavam casos de NMTC e/ou de MNG, mas não preenchiam os critérios para pertencer a qualquer dos dois tipos de famílias anteriormente descritos. Neste estudo, foram analisadas 7 famílias (Figuras III.1-III.7) que apresentavam FNMTC, sendo que entre estas famílias, 2 apresentavam casos de carcinomas do ovário (não existe informação sobre subtipo histológico) e 1 família apresentava um caso de tumores de células *Sertoli-Leydig* do ovário (SLTC). Nas famílias com FNMTC estudadas, os tumores da tiróide mais frequentes foram os cPTC (30,6%; PTC variante clássica) e os fvPTC (5,6%; PTC variante folicular), para além destes carcinomas, observou-se que alguns membros destas famílias também apresentavam lesões benignas da tiróide, tais como, bócio multinodular (MNG) e adenomas foliculares (FTA) (ver tabela V dos anexos).

No presente estudo, analisaram-se ainda 4 famílias (Figuras III.8-III.11) que apresentavam FMNG, 4 famílias (Figuras III.12 e III.15) que apresentavam NMTC/MNG (1 destas famílias apresentava um caso de carcinoma do ovário, não existe informação sobre subtipo histológico), e uma doente (identificada nesta tese com o número 17) que apresentava MNG associado a tumor das células lipóides do ovário (ver tabelas VI, VII e VIII dos anexos).

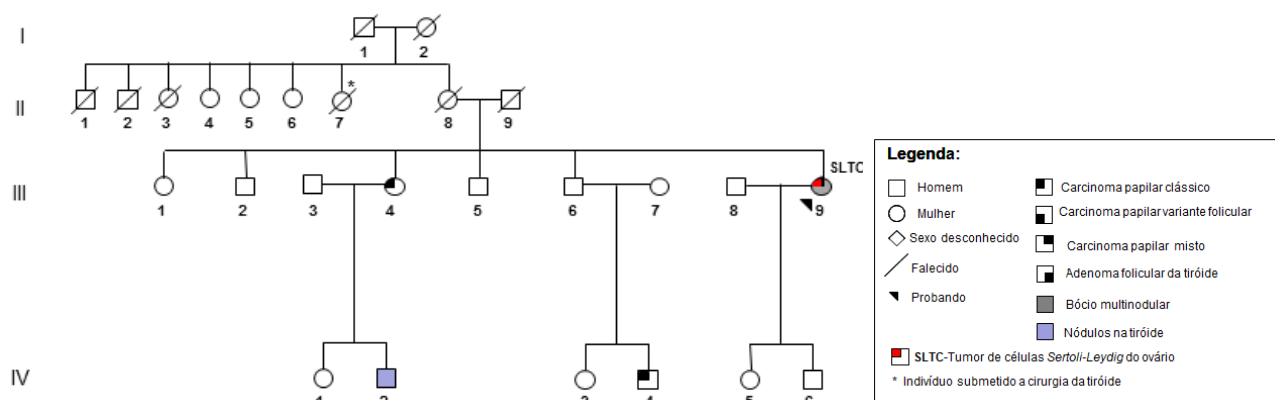


Figura III.1 - Árvore genealógica da família 2 com FNMTCT, que foi alvo de estudo do gene *DICER1*.

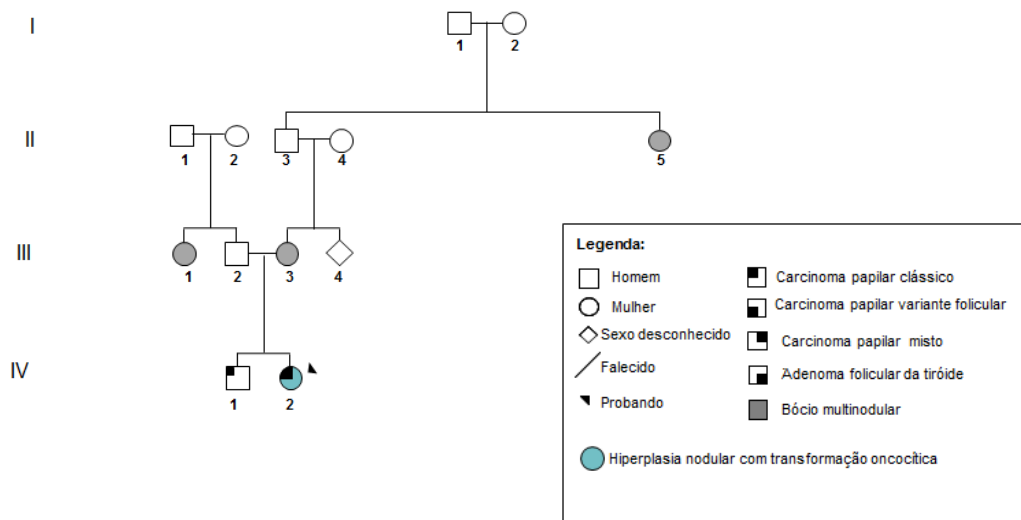


Figura III.2 - Árvore genealógica da família 3 com FNMTTC, que foi alvo de estudo do gene *DICER1*.

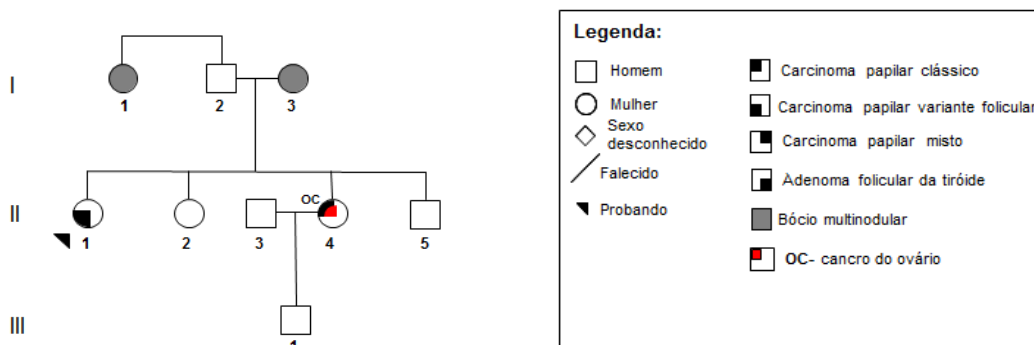


Figura III.3 - Árvore genealógica da família 4 com FNMTTC, que foi alvo de estudo do gene *DICER1*.

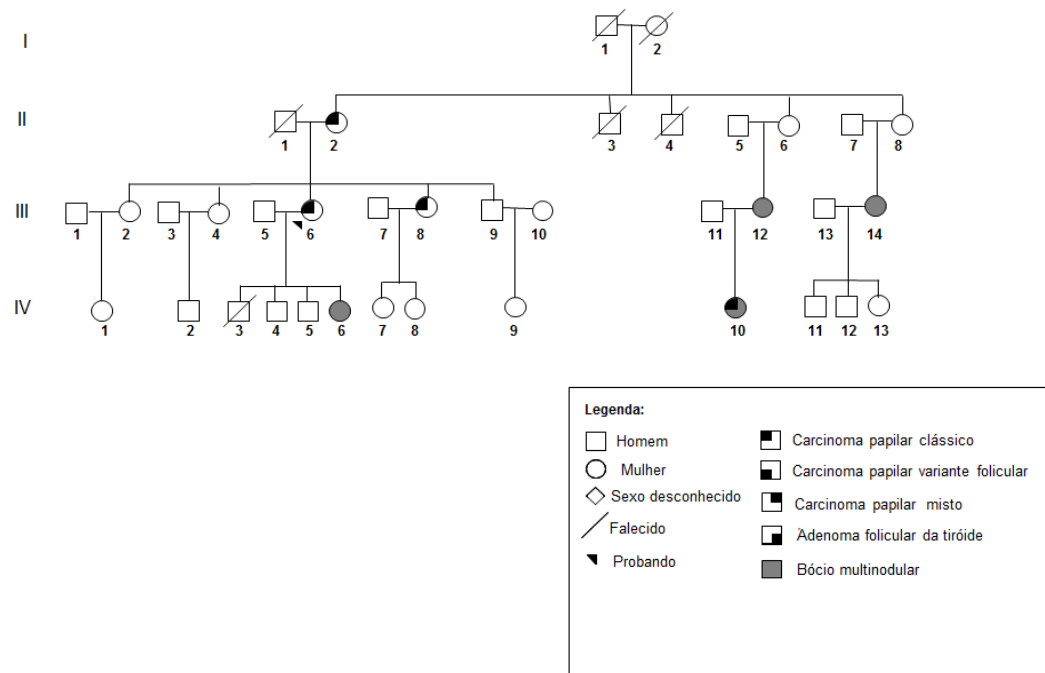


Figura III.4 - Árvore genealógica da família 5 com FNMTTC, que foi alvo de estudo do gene *DICER1*.

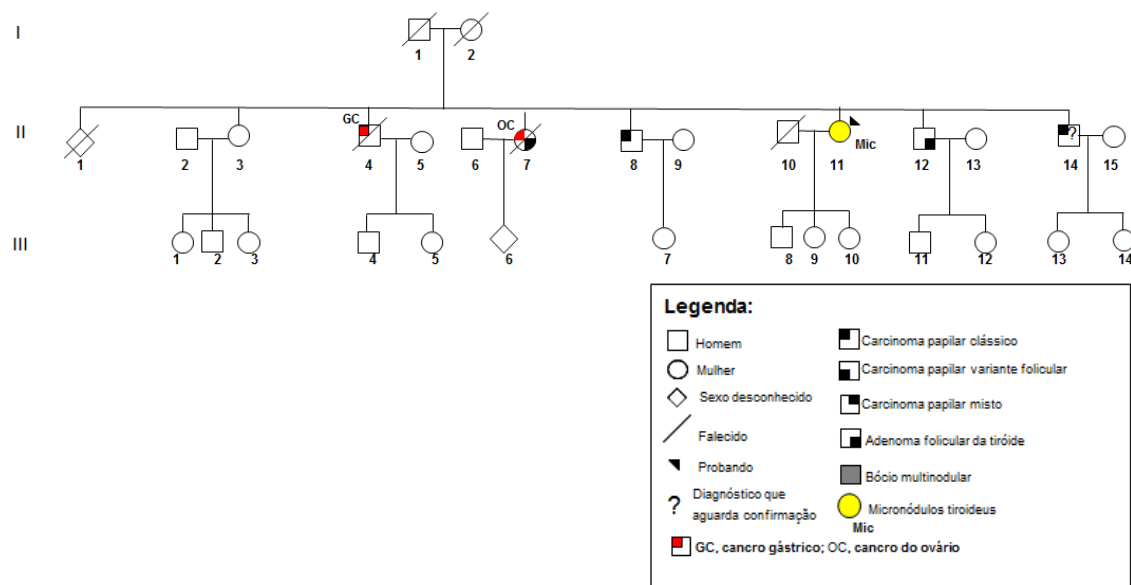


Figura III.5 - Árvore genealógica da família 6 com FNMTTC, que foi alvo de estudo do gene *DICER1*.

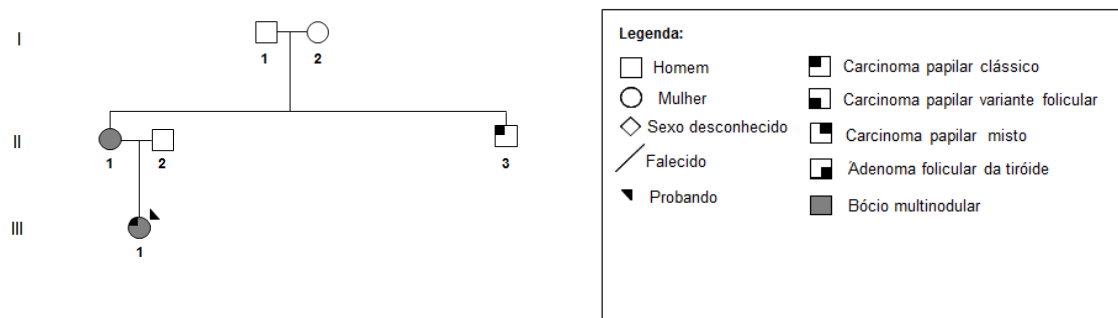


Figura III.6 - Árvore genealógica da família 7 com FNMTTC, que foi alvo de estudo do gene *DICER1*.

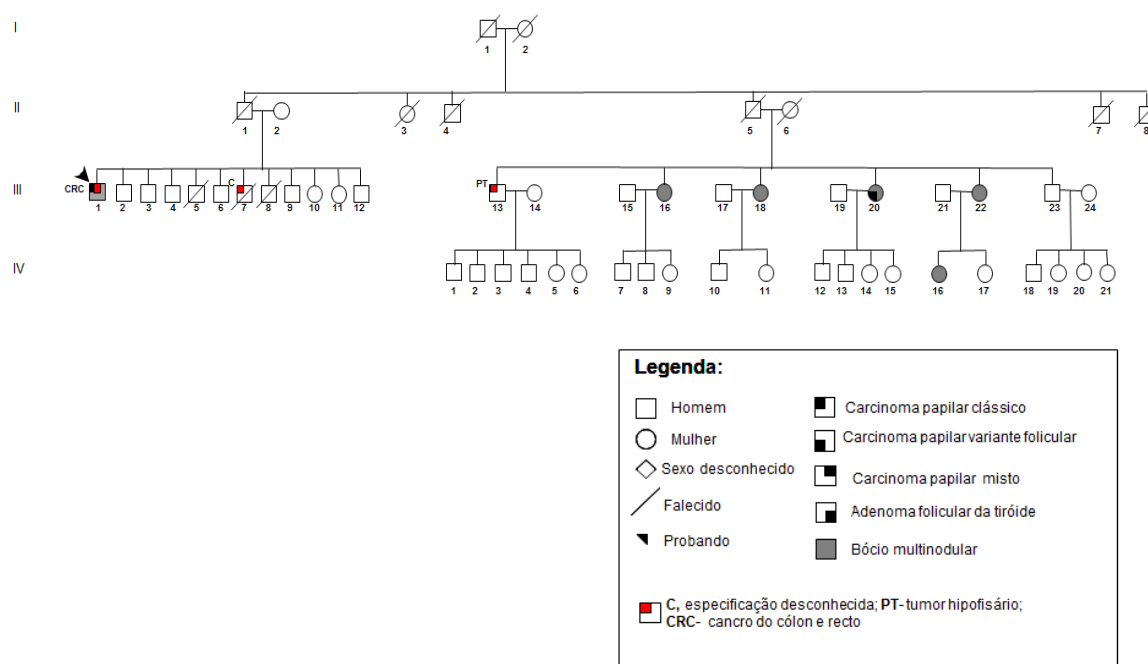


Figura III.7 - Árvore genealógica da família 8 com FNMTTC, que foi alvo de estudo do gene *DICER1*.

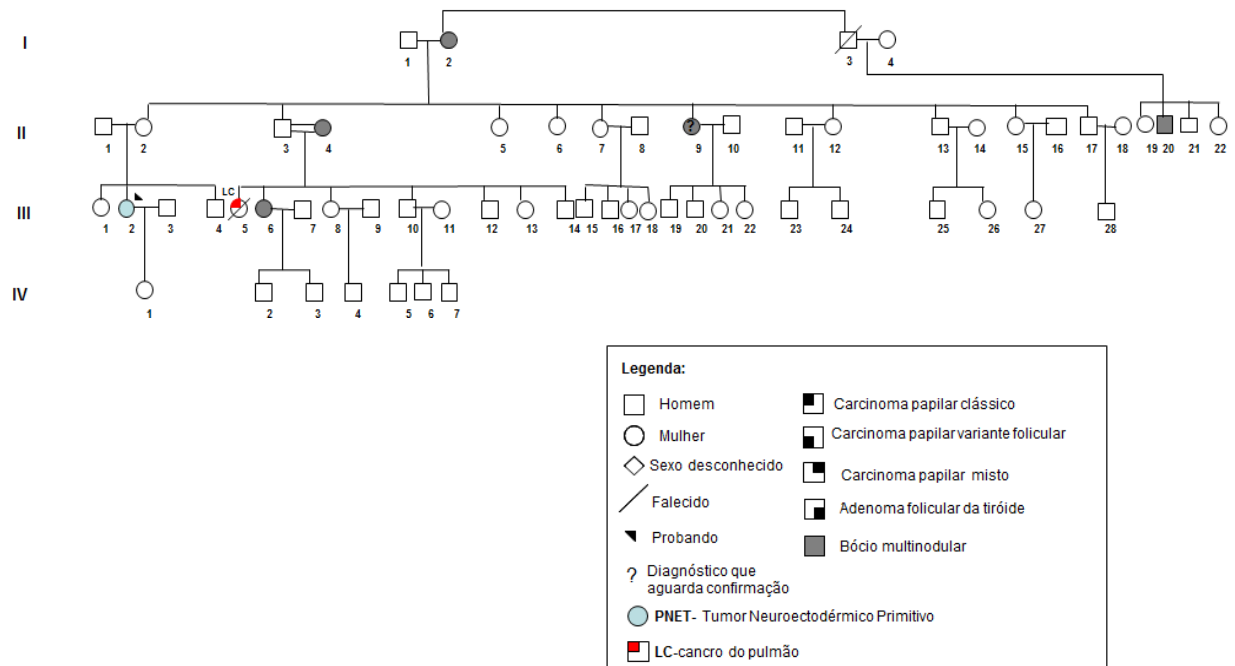


Figura III.8 - Árvore genealógica da família 9 com FMNG, que foi alvo de estudo do gene *DICER1*.

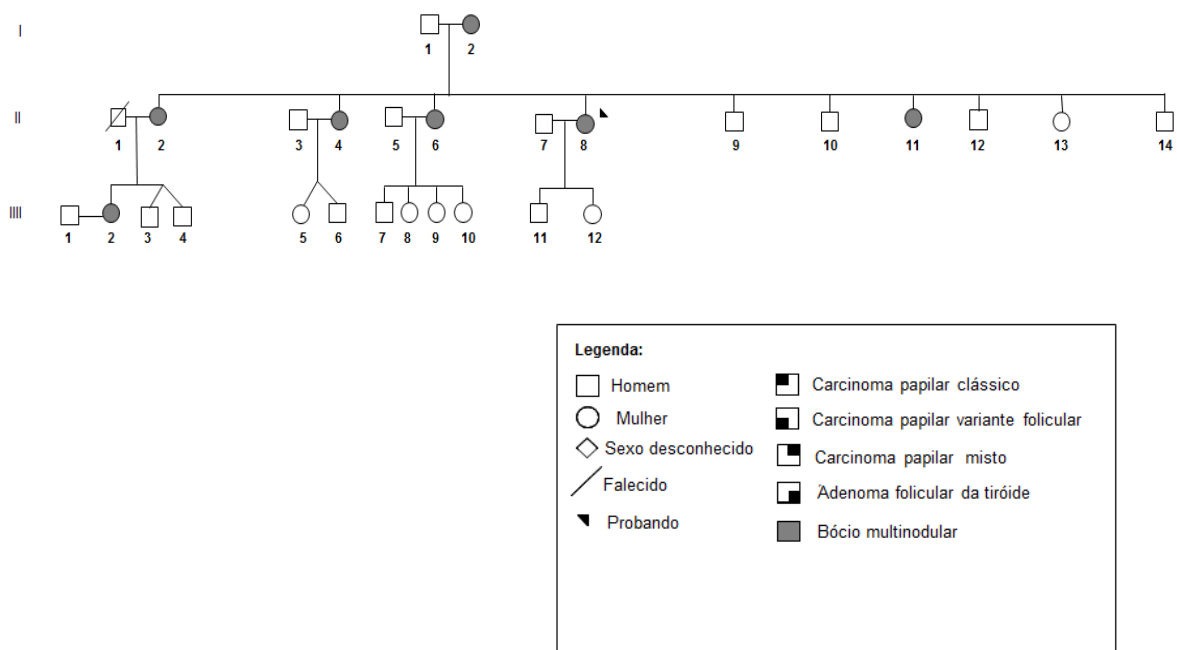


Figura III.9 - Árvore genealógica da família 10 com FMNG, que foi alvo de estudo do gene *DICER1*.

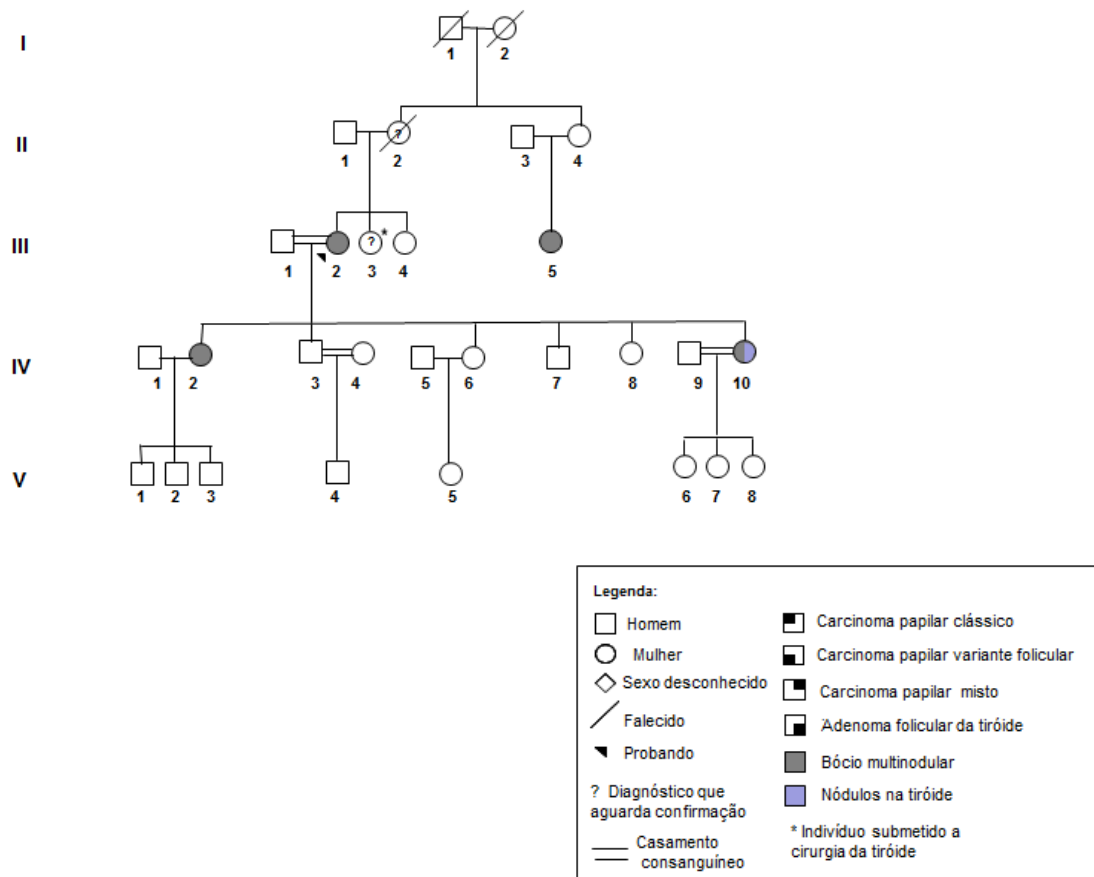


Figura III.10 - Árvore genealógica da família 11 com FMNG, que foi alvo de estudo do gene *DICER1*.

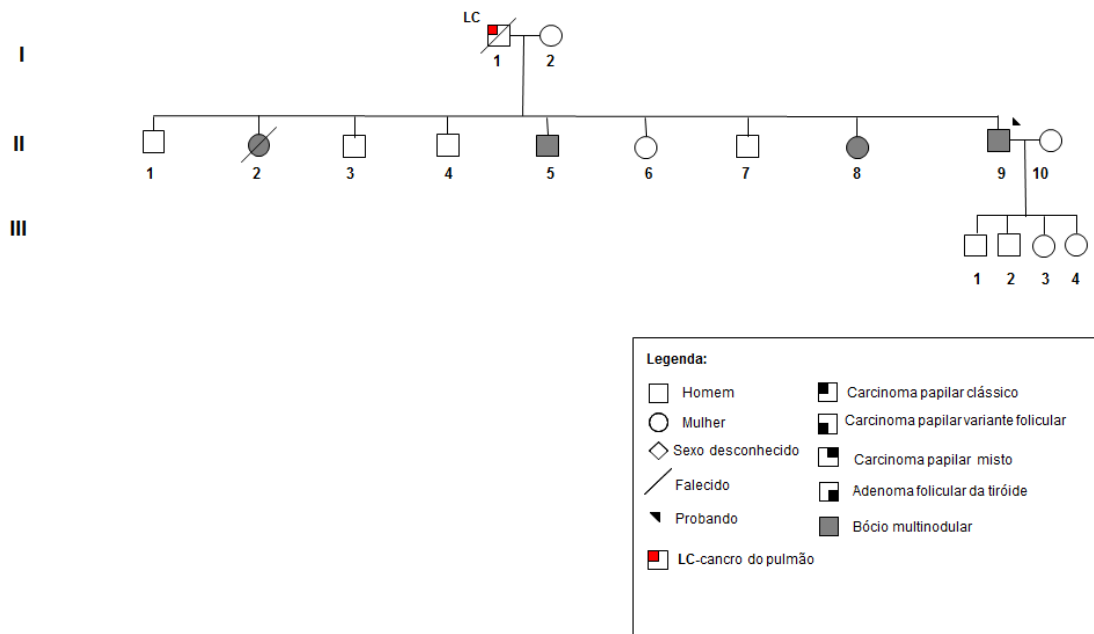


Figura III.11 - Árvore genealógica da família 12 com FMNG, que foi alvo de estudo do gene *DICER1*.

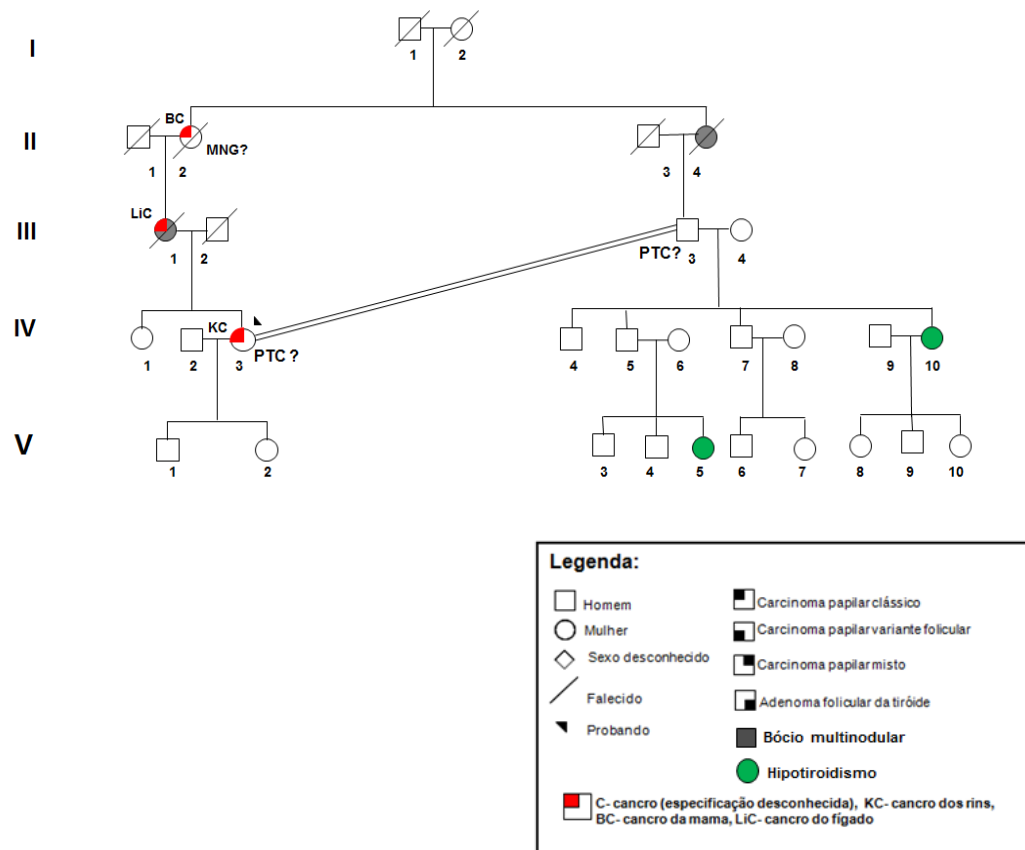


Figura III. 12 - Árvore genealógica da família 13 com NMTC/MNG, que foi alvo de estudo do gene *DICER1*.

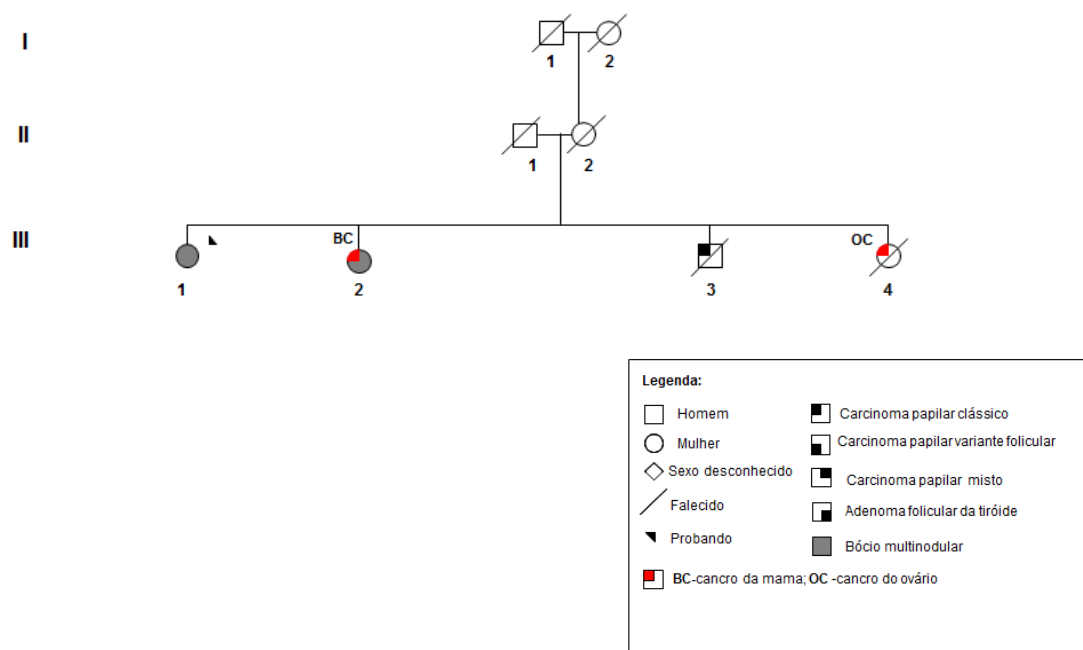


Figura III.13 - Árvore genealógica da família 14 com NMTC/MNG, que foi alvo de estudo do gene *DICER1*.

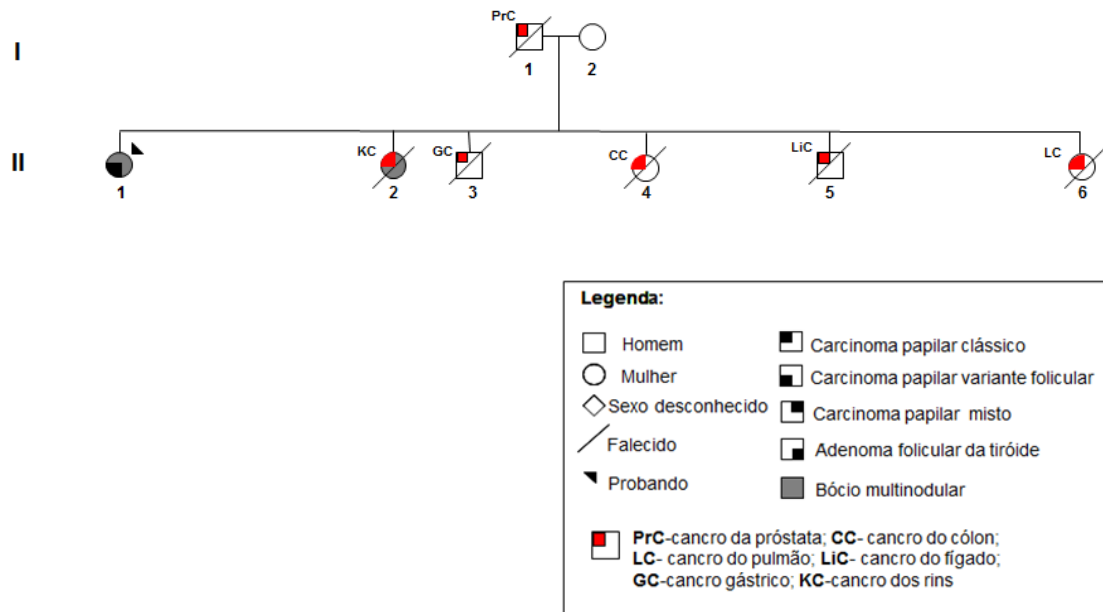


Figura III.14 - Árvore genealógica da família 15 com NMTC/MNG, que foi alvo de estudo do gene *DICER1*.

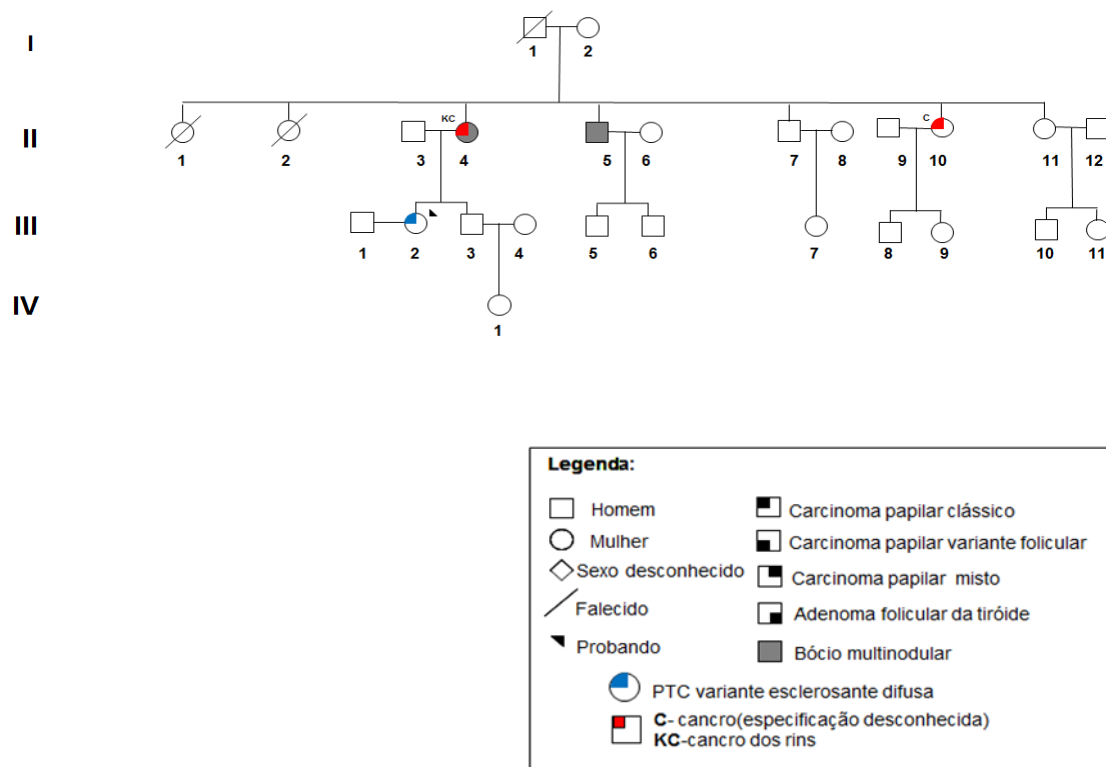


Figura III.15 - Árvore genealógica da família 16 com NMTC/MNG, que foi alvo de estudo do gene *DICER1*.

1.2 Identificação de variantes genéticas no gene *DICER1*

O gene *DICER1* foi analisado em amostras de DNA de 15 probandos de famílias com FNMTC, FMNG, ou de famílias com NMTC/MNG (que não preenchiam os critérios para pertencer aos outros dois grupos de famílias), e ainda 1 caso isolado de MNG associado com tumor das células lipóides do ovário. Nestas amostras, foram sequenciados os 27 exões (um total de 13 segmentos) do gene *DICER1*. As variantes foram identificadas por comparação com as sequências disponíveis nas bases de dados ENSEMBL (www.ensembl.org) e NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As variantes com uma frequência inferior a 1% na população foram designadas por variantes raras, enquanto que as variantes com uma frequência superior ou igual a 1% foram designadas por polimorfismos.

No presente estudo, foram identificadas 7 variantes intrónicas no gene *DICER1*, das quais, 2 se encontram descritas em bases de dados e 5 são variantes que não se encontram descritas nas bases de dados NCBI ou ENSEMBL, com a presente nomenclatura. No entanto, neste gene, não foram detectadas variantes potencialmente patogénicas (Tabela III.1).

Tabela III.1 - Variantes intrónicas identificadas no gene *DICER1* nos probandos das famílias estudadas.

N.º da família/ Doente	Tipo de família	Variantes intrónicas identificadas no gene <i>DICER1</i>			
		Intrão 11		Intrão 22	
		Variante genética	Heterozigotia/ Homozigotia	Variante genética*	Heterozigotia/ Homozigotia
2	FNMTC	c.2145+43C>T	Heterozigotia	c.4444+9G>T ^a ; c.4444+11delGTGT ^b ; c.4444+11delGTGTGT ^c	a) Homozigotia b),c) Heterozigotia
3	FNMTC	c.2145+43C>T	Heterozigotia	c.4444+9G>T ^a ; c.4444+11delGT ^b ; c.4444+11delGTGT ^c	a) Homozigotia b),c) Heterozigotia
4	FNMTC	x	x	c.4444+9G>T ^a ; c.4444+11delGTGT ^b ; c.4444+11delGTGTGT ^c	a) Homozigotia b),c) Heterozigotia
5	FNMTC	x	x	c.4444+9G>T ^a ; c.4444+11delGTGT ^b ; c.4444+11delGTGTGT ^c	a) Homozigotia b),c) Heterozigotia
6	FNMTC	x	x	c.4444+9G>T ^a ; c.4444+11delGT ^b ; c.4444+11delGTGT ^c	a) Homozigotia b),c) Heterozigotia
7	FNMTC	c.2145+43C>T	Heterozigotia	c.4444+9G>T ^a ; c.4444+11delGTGT ^b ; c.4444+11delGTGTGTG TGTGT ^c	a) Homozigotia b),c) Heterozigotia
8	FNMTC	c.2145+43C>T	Heterozigotia	c.4444+9G>T ^a ; c.4444+11delGT ^b ; c.4444+11delGTGT ^c	a) Homozigotia b),c) Heterozigotia
9	FMNG	x	x	c.4444+9G>T ^a ; c.4444+11delGT ^b ; c.4444+11delGTGT ^c	a) Homozigotia b),c) Heterozigotia
10	FMNG	c.2145+43C>T	Heterozigotia	c.4444+9G>T ^a ; c.4444+11delGTGT ^b ; c.4444+11delGTGTGT ^c	a) Homozigotia b),c) Heterozigotia
11	FMNG	c.2145+43C>T	Heterozigotia	c.4444+9G>T ^a ; c.4444+11delGT ^b ; c.4444+11delGTGT ^c	a) Homozigotia b),c) Heterozigotia
12	FMNG	x	x	c.4444+9G>T ^a ; c.4444+11delGTGT ^b ; c.4444+11delGTGTGT ^c	a) Homozigotia b),c) Heterozigotia
13	NMTC/ MNG	x	x	c.4444 + 9G>T; c.4444+11delGTGT**	Heterozigotia
14	NMTC/ MNG	x	x	c.4444 + 9G>T; c.4444+11delGTGT; c.4444+11delGTGTGTG TGTGTGT	Heterozigotia
15	NMTC/ MNG	c.2145+43C>T	Homozigotia	c.4444+9G>T ^a ; c.4444+11delGTGT ^b ; c.4444+11delGTGTGT ^c	a) Homozigotia b),c) Heterozigotia
16	NMTC/ MNG	x	x	c.4444+9G>T; c.4444+11delGT; c.4444+11delGTGT	Heterozigotia
17	—	c.2145+43C>T	Heterozigotia	c.4444+9G>T ^a ; c.4444+11delGTGT ^b ; c.4444+11delGTGTGTG TGTGT ^c	a) Homozigotia b),c) Heterozigotia

x, não foram detectadas variantes neste intrão; —, o n.º 17 diz respeito a uma doente sem história familiar.

*, A região em que se identificou as variantes no intrão 22, é uma sequência de microssatélites que contém 20 repetições de GT; **, resultado da análise aguarda confirmação.

1.2.1 Polimorfismos intrónicos identificados no gene *DICER1*

Nos 16 probandos estudados identificaram-se 2 polimorfismos intrónicos, que se encontram descritos na base de dados ENSEMBL (Tabelas III.1 e III.2).

Tabela III. 2- Polimorfismos intrónicos identificados no gene *DICER1* em probandos das famílias estudadas.

Gene <i>DICER1</i>	Variante	Probandos* (N=16) Alelo/n/Frequência (%)	População Europeia** (N=379) Alelo/n/Frequência (%)
	rs11624081 c.2145+43C>T	T/9/28,1	T/85/11,2
	rs1778057 c.4444+9G>T	T/29/90,6	T/601/79,3

*, Probandos das famílias estudadas nesta tese (incluindo a doente n.º 17); **, base de dados ENSEMBL; N- número total de indivíduos estudados; n- número de alelos.

O polimorfismo rs11624081 localiza-se no intrão 11 e o polimorfismo rs1778057 localiza-se no intrão 22. Ambos os polimorfismos se encontram na região não-codificante do gene *DICER1*. Observou-se que o polimorfismo rs1778057 se encontrava presente em todos os probandos das famílias estudadas (em 13 dos casos em homozigotia e nos restantes 3 em heterozigotia) e que o polimorfismo rs11624081 se encontrava presente em 28,1% dos casos estudados (em 7 dos casos em heterozigotia e num caso em homozigotia).

1.2.2 Variantes intrónicas identificadas no gene *DICER1*

No presente estudo, foram ainda identificadas 5 variantes intrónicas numa sequência de microsatélites, não descritas com a presente nomenclatura na literatura ou nas bases de dados NCBI ou ENSEMBL. No entanto, o estudo de 30 controlos normais da população Portuguesa revelou que estas variantes se apresentavam com frequências alélicas > 1%, sugerindo que se tratam de polimorfismos (Tabela III.3).

Tabela III. 3- Novas variantes intrónicas identificadas no gene *DICER1* em probandos das famílias estudadas.

Gene <i>DICER1</i>	Variante	Probandos* (N=16) n/Frequência (%)	Controlos normais (N=30) n/Frequência (%)
	c.4444+11delGT	6/18,8	10/16,7
	c.4444+11delGTGT	16/50,0	25/41,7
	c.4444+11delGTGTGTGT	6/18,8	10/16,7
	c.4444+11delGTGTGTGTGT GT	2/6,3	3/5,0
	c.4444+11delGTGTGTGTGTGT GTGT	1/3,1	3/5,0

*, Probandos das famílias estudadas nesta tese (incluindo a doente n.º 17); N- número total de indivíduos estudados; n- número de alelos.

1.2.2.1 Variante c.4444+11delGT no gene *DICER1*

A variante c.4444+11delGT foi identificada no gene *DICER1*, e consiste na deleção de um dinucleótido GT (guanina e timina). Esta variante localiza-se no nucleótido 11 do intrão 22 e foi identificada em 3 probandos de famílias com FNMTC, em 2 probandos de famílias com FMNG e num probando de uma família com NMTC e MNG.

1.2.2.2 Variante c. 4444+11delGTGT no gene *DICER1*

A variante c.4444+11delGTGT foi identificada no gene *DICER1*, e consiste na deleção de dois dinucleótidos GT. Esta variante localiza-se no nucleótido 11 do intrão 22 e foi identificada em todos os probandos das famílias estudadas, e numa doente que apresentava MNG associado a tumor das células lipóides do ovário.

1.2.2.3 Variante c.4444+11delGTGTGT no gene *DICER1*

A variante c.4444+11delGTGTGT foi identificada no gene *DICER1*, e consiste na deleção de três dinucleótidos GT. Esta variante localiza-se no nucleótido 11 do intrão 22 e foi identificada em 3 probandos de famílias com FNMTC, em 2 probandos de famílias com FMNG e num probando de uma família com NMTC e MNG.

1.2.2.4 Variante c.4444+11delGTGTGTGTGTGT no gene *DICER1*

A variante c.4444+11delGTGTGTGTGTGTGT foi identificada no gene *DICER1*, e consiste na deleção de seis dinucleótidos GT. Esta variante localiza-se no nucleótido 11 do intrão 22 e foi identificada num probando de uma família com FNMTC e numa doente que apresentava MNG associado a tumor das células lipóides do ovário.

1.2.2.5 Variante c.4444+11delGTGTGTGTGTGTGT no gene *DICER1*

A variante c.4444+11delGTGTGTGTGTGTGTGT foi identificada no gene *DICER1*, e consiste na deleção de sete dinucleótidos GT. Esta variante localiza-se no nucleótido 11 do intrão 22, e foi identificada num probando de uma família com NMTC e MNG.

Na figura III.16 encontra-se um esquema do gene *DICER1* (do exão 10 ao exão 27), onde se encontram assinaladas as variantes intrónicas identificadas nas famílias estudadas.

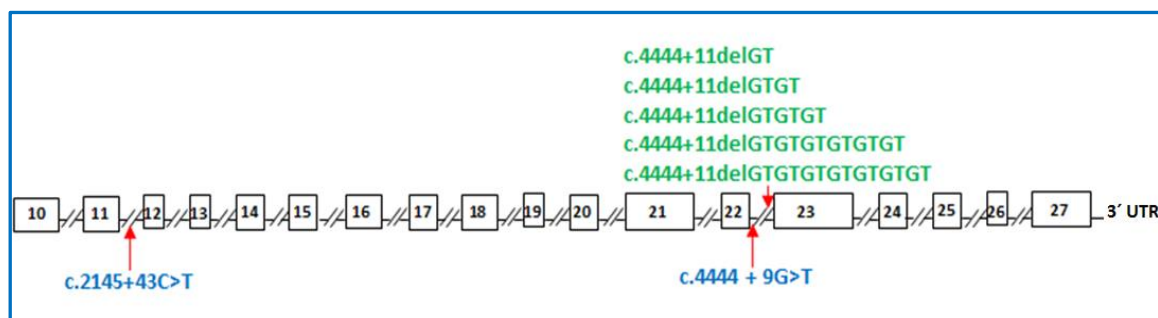


Figura III.16 - Variantes identificadas no gene *DICER1*. Representação do gene *DICER1* (do exão 10 ao exão 27). Os retângulos indicam os exões, que se encontram representados proporcionalmente ao seu tamanho. Os símbolos (---) representam os intrões e não estão representados proporcionalmente ao seu tamanho. As setas indicam a localização das variantes identificadas. As variantes intrônicas descritas em bases de dados estão assinaladas a azul, e as variantes que ainda não se encontram descritas em bases de dados, com a presente nomenclatura estão assinaladas a verde. As regiões 3'-UTR (*Untranslated Regions*) são regiões não-traduzidas.

2. Estudo de uma nova variante no gene *C8orf48* identificada na família 1 com FNMTTC

Numa primeira etapa do estudo da família 1, com FNMTTC, o nosso grupo mapeou o gene de susceptibilidade na região cromossômica 8p23.1-p22 (*FTEN*) (Cavaco *et al.*, 2008b). Num estudo posterior, que envolveu a sequenciação global do exoma de um dos familiares desta família (indivíduo II.8; Figura III.17) identificámos uma nova variante, potencialmente patogénica, no gene *C8orf48* (Pereira, 2012). A variante consistia na transição de uma citosina para uma timina (c.65C>T), em heterozigotia. Esta alteração no codão 22, é esperado conduzir à substituição de um resíduo treonina por um resíduo isoleucina na proteína (p.T22I). Aquando da sua detecção, esta variante ainda não se encontrava descrita nas bases de dados NCBI ou ENSEMBL. No entanto, foi recentemente descrita nas referidas bases de dados, tendo sido encontrada (em heterozigotia) num indivíduo de uma população de 285 descendentes de Europeus. A variante do gene *C8orf48*, c.65C>T (p.T22I), tendo sido identificada num estudo da população Europeia recebeu a designação de rs201250059. No entanto trata-se de uma variante muito rara e não de um polimorfismo, porque a frequência observada para o alelo T na população Europeia é muito baixa [frequência alélica em 285 controlos analisados = 0,18% (1/570)].

Nesta família, para além do probando (III.14) e do indivíduo II.8, observou-se que 14 outros familiares também eram portadores da referida variante no gene *C8orf48* (II.3, II.6, II.14, II.16, II.18, II.23, III.9, III.12, III.21, III.22, III.23, III.26, III.32 e III.33), ou seja, a variante segregava com a doença na família (Figura III.17).

Os indivíduos portadores da variante no gene *C8orf48*: II.6, II.14, II.18, II.23, III.21, III.22, III.23 e III.26 apresentavam MNG, o indivíduo II.3 apresentava FTA, os indivíduos II.8 e III.12 apresentavam FTA e cPTC, os indivíduos II.16 e III.14 apresentavam cPTC e o indivíduo III.9

apresentava cPTC e fvPTC. Observou-se ainda que 2 familiares, os indivíduos III.25 e o III.29, apresentavam MNG, mas não eram portadores da variante no gene *C8orf48*, tratando-se possivelmente de fenocópias. Os indivíduos III.32 e III.33 eram portadores da variante, no entanto não manifestavam a doença, provavelmente, devido ao facto de ainda serem jovens.

Esta variante não se encontrava presente em 50 controlos normais, assim sendo, não se trata um polimorfismo comum na população Portuguesa.

Para averiguar se esta variante está envolvida na tumorigénese da tiróide, no projecto desenvolvido nesta tese de Mestrado, construiu-se um plasmídeo com a variante c.65C>T na região codificante do gene *C8orf48* (*insert*) e iniciou-se a optimização dos ensaios funcionais.

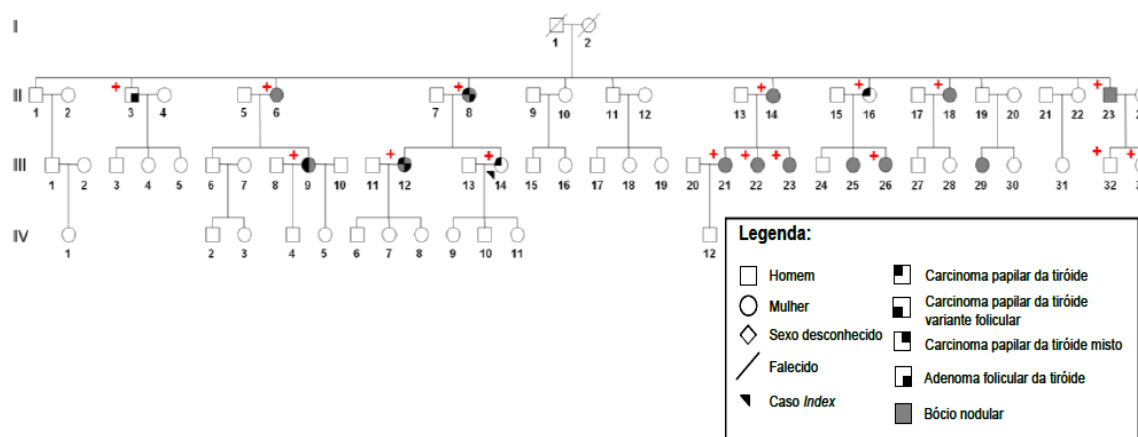


Figura III.17: Árvore genealógica da família 1, na qual foi identificada uma nova variante (c.65C>T) no gene *C8orf48* (Pereira, 2012).

2.1 Estudo da co-segregação da variante p.T22I com polimorfismos do gene *C8orf48* na família 1

A sequenciação do gene *C8orf48* identificou, para além da variante rara p.T22I (c.65C>T), dois polimorfismos: o rs13273355 (c.83C>T) e o rs11203497 (c.853T>A). Nesta família, todos os indivíduos estudados apresentavam o polimorfismo rs13273355 (c.83C>T), que é esperado conduzir à substituição de um resíduo serina por um resíduo fenilalanina no codão 28 (p.S28F). Observou-se também que esta última alteração se encontrava em homozigotia ou em heterozigotia nos diferentes familiares. O polimorfismo rs11203497 (c.853T>A), que é esperado conduzir à substituição de um resíduo lisina por um resíduo metionina no codão 285 (p.L285M) encontrava-se em homozigotia em todos os familiares analisados. Na população Europeia a frequência do alelo A é de 100%, tendo o alelo T sido detectado apenas na população Africana (frequência alélica = 5%) e na população Americana (frequência alélica = 0,3%). Desta forma, este polimorfismo apenas foi caracterizado para alguns familiares, dada a rara ocorrência do alelo T na população Europeia (Tabela III.4). O estudo de segregação, nesta família, do haplotipo TCA para as variantes rs201250059, rs13273355 e rs11203497 mostrou que este

estava presente no probando e nos indivíduos II.3, II.6, II.8, II.14, II.16, II.18, II.23, III.9, III.12, III.14, III.21, III.22, III.23, III.26, III.32 e III.33. Deste modo, nesta família, o haplotipo TCA estava presente em indivíduos afectados com lesões da tiróide, e em dois familiares jovens (III.32 e III.33), que não apresentavam doença tiroideia (Figura III.18). Esta análise dos haplotipos na família 1 permitiu definir a sequência do gene *C8orf48* nos indivíduos afectados, que foi utilizada para a mutagénese dirigida e estudos funcionais.

Tabela III.4 - Estudo da segregação das variantes do gene *C8orf48*.

Gene <i>C8orf48</i>	Variante	Família 1 com FNMTc	População Europeia Frequência (%)
	rs201250059 c.65C>T	C ou T (em heterozigotia)	T=0,18% (1/570)
	rs13273355 c.83C>T	T (em homo ou em heterozigotia)	T=82,6% (626/758)
	rs11203497 c.853T>A	A (em homozigotia) *	A=100% (758/758)

(*), o segmento que continha esta alteração, apenas foi estudado para alguns indivíduos da família 1. A variante potencialmente patogénica está representada a vermelho.

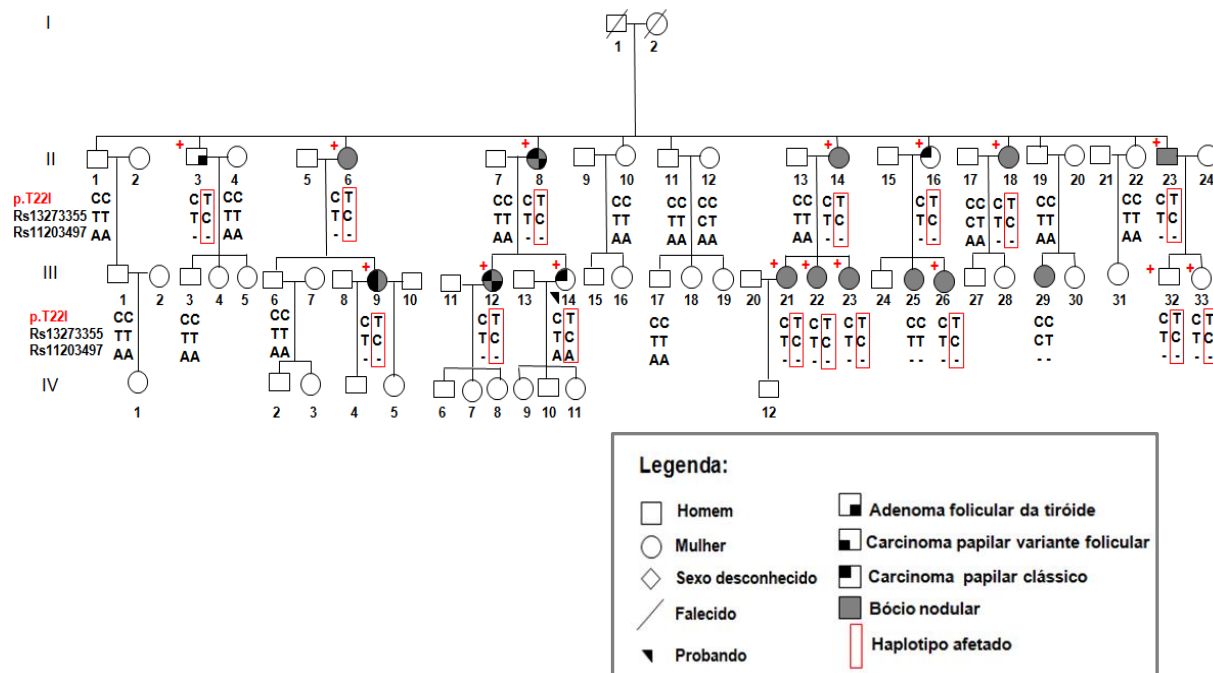


Figura III.18 - Árvore genealógica da família 1. Estudo de segregação das variantes do gene *C8orf48* rs201250059 (c.65C>T), rs13273355 e rs11203497.

3. Estudo funcional da variante p.T22I do gene *C8orf48*

3.1 Preparação de construções derivadas do plasmídeo pcDNA3NeoMyc

Para o estudo funcional da variante c.65C>T (p.T22I) identificada no gene *C8orf48* na família 1, numa etapa inicial, construíram-se 2 plasmídeos derivados do pcDNA3NeoMyc: o plasmídeo que expressava o gene *C8orf48 wild type* (pcDNA3NeoMyc-C8ORF48 WT) e o plasmídeo que expressava o gene *C8orf48* com a variante c.65C>T (pcDNA3NeoMyc-C8ORF48 MUT).

Para a construção dos plasmídeos, inicialmente, procedeu-se à hidrólise do vector pcDNA3NeoMyc e do *insert C8orf48* (sequência codificante do gene) com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*. Na figura III.19 encontra-se representado o resultado da electroforese em gel de agarose dos fragmentos resultantes das respectivas hidrólises.

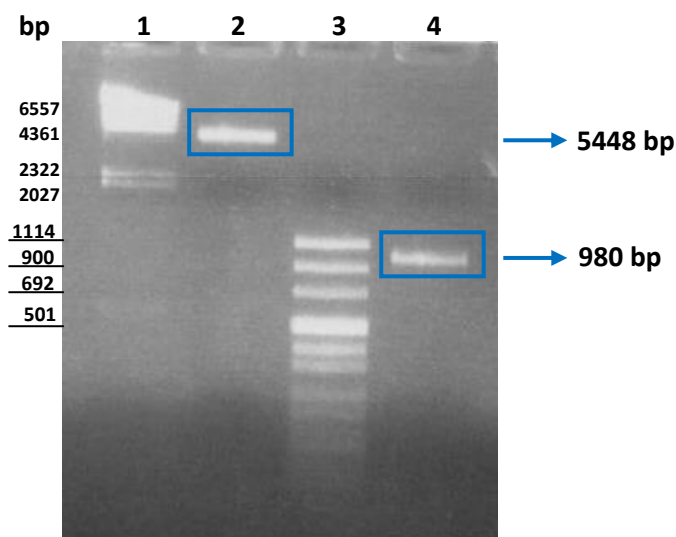


Figura III.19 - Electroforese em gel de agarose 1% (p/v) dos produtos da hidrólise, com as enzimas *EcoRI* e *BamHI*, do *insert C8orf48* (980 bp) (poço 4) e do plasmídeo pcDNA3NeoMyc (5448 bp) (poço 2). Poço 1 - Marcador Lambda DNA/HindIII; Poço 3 - Marcador pUC8.

De seguida, realizou-se a ligação do plasmídeo pcDNA3NeoMyc com o *insert C8orf48* e transformaram-se bactérias competentes com o plasmídeo resultante. Prepararam-se *minipreps* do plasmídeo e utilizou-se o DNA para amplificar a região em que se inseriu o *insert*, com os *primers* pCMV e pGMR (*primers* que flanqueiam a região em que se inseriu o *insert*), sendo o tamanho do produto esperado de 1279 bp. Analisou-se o resultado de cada amplificação por electroforese em gel de agarose de 1% (p/v) (Figura III.20). A inserção do gene *C8orf48* no plasmídeo foi ainda confirmada através da sequenciação das *minipreps*, com os *primers* pCMV e pGMR (Figura III.21).

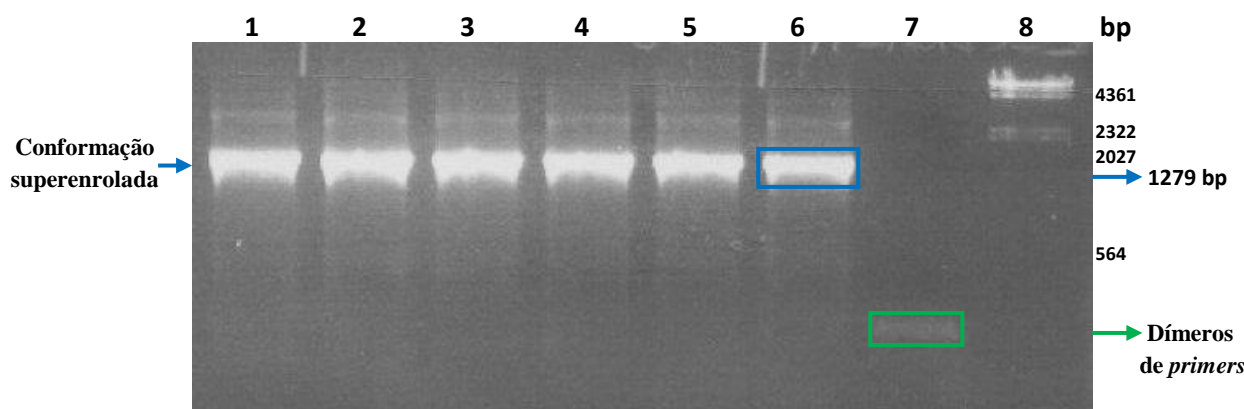


Figura III.20 - Electroforese em gel de agarose de 1% (p/v) dos produtos de amplificação por PCR do DNA do plasmídeo com o *insert C8orf48* em 6 *minipreps* (poços 1-6). Poço 7- Controle negativo; Poço 8 - Marcador Lambda DNA/HindIII.

Seguidamente, realizou-se a mutagénese do gene *C8orf48* (*insert*). Para tal, utilizaram-se *primers* específicos (as sequências encontram-se descritas na tabela IV dos anexos) para inserir a variante (c.65C>T). Transformaram-se bactérias competentes com os plasmídeos resultantes das reacções de mutagénese e prepararam-se *minipreps*. Por fim, realizou-se a sequenciação das *minipreps* obtidas, para confirmar a introdução da variante na sequência do gene (Figura III.21).

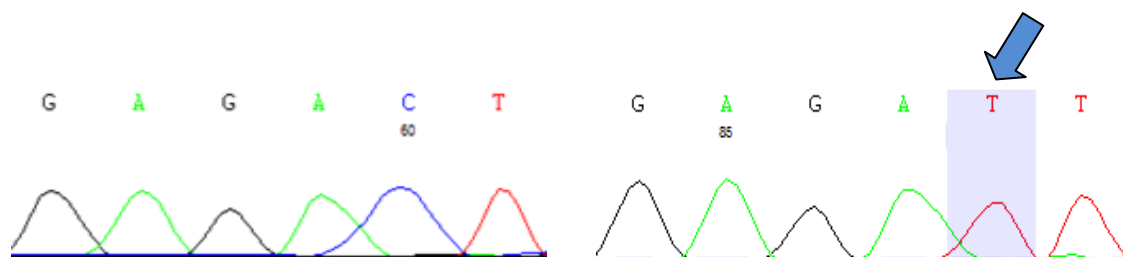


Figura III.21 - Sequenciação do DNA plasmídico contendo o *insert C8orf48* wild type (imagem à esquerda) e sequenciação do DNA plasmídico contendo o *insert C8orf48* com a variante c.65C>T (imagem à direita). A seta assinala a variante inserida.

3.2 Transfecções transientes de células TPC-1 com construções derivadas do plasmídeo pcDNA3NeoMyc

Para investigar qual o efeito da variante p.T22I do gene *C8orf48* em células de carcinoma papilar de tiróide humana, realizaram-se ensaios *in vitro* utilizando a linha celular TPC-1. Para a caracterização funcional da referida variante, as células TPC-1 foram transfectadas de forma transiente com os seguintes plasmídeos: pcDNA3NeoMyc-C8ORF48 WT, pcDNA3NeoMyc-C8ORF48 MUT e pcDNA3NeoMyc “vazio” (sem o gene *C8orf48*). Nos textos que se seguem serão utilizadas as abreviaturas: pcDNA3 WT (pcDNA3NeoMyc-C8ORF48 WT), pcDNA3 MUT (pcDNA3NeoMyc-C8ORF48 MUT) e pcDNA3 vazio (pcDNA3NeoMyc “vazio”).

Para a transfecção transiente das células TPC-1, plaquearam-se $1,0 \times 10^5$ células TPC-1/poço, em 9 poços de uma placa (de 24 poços), em meio RPMI 10% FBS. Após 24 horas, transfectaram-se as células com os diferentes plasmídeos.

3.3 Ensaios de viabilidade celular com células TPC-1 transfectadas de forma transiente

Para avaliar a viabilidade das células TPC-1 transfectadas de forma transiente com diferentes plasmídeos, foi utilizado o método colorimétrico *CellTiter 96R Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay*. Este método é constituído pelos reagentes MTS e PMS. O MTS é bio reduzido pelas células num produto formazano. A quantidade de formazano é, posteriormente, medida a 490 nm e é directamente proporcional ao número de células viáveis existentes em cultura.

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados em triplicados, para dois *time-points*: 48 e 72 horas após a transfecção, utilizando uma confluência celular de ~ 60% (Figura III.22).

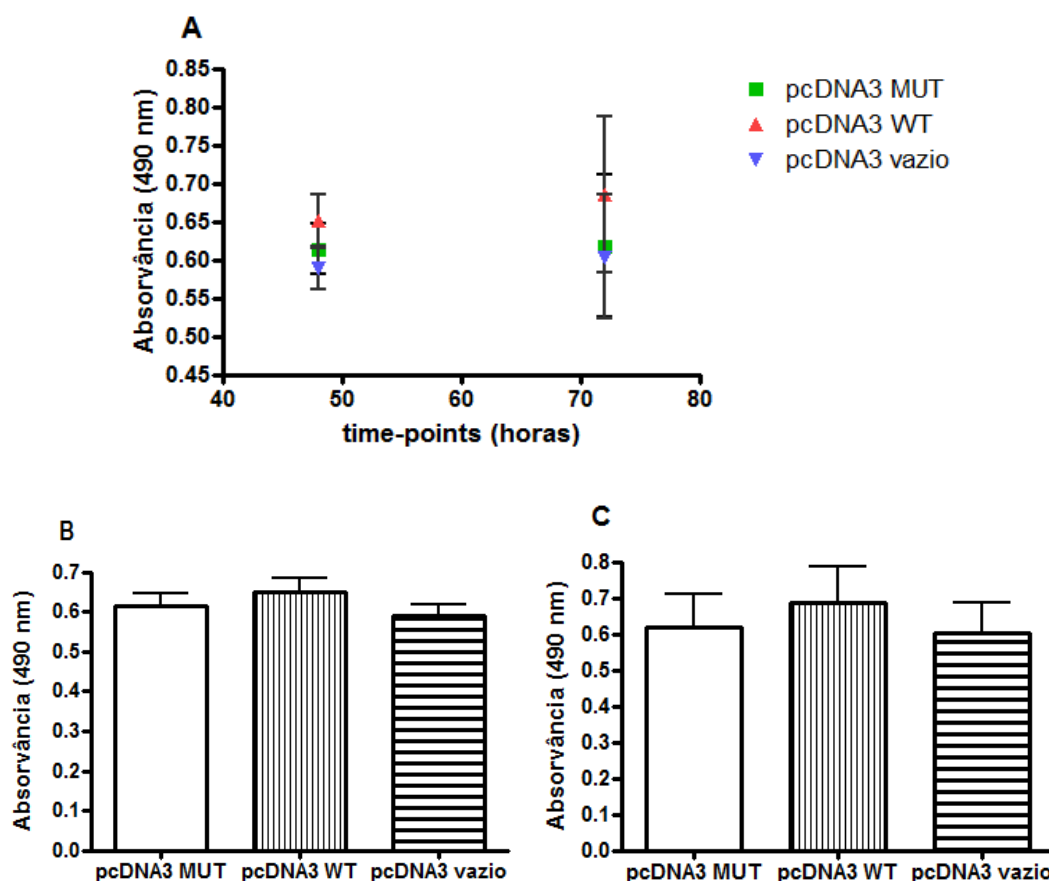


Figura III. 22 - Ensaio de viabilidade celular com as células TPC-1 transfectadas com os plasmídeos pcDNA3 MUT, pcDNA3 WT e pcDNA3 vazio. A absorbância a 490 nm para as células transfectadas com os diferentes plasmídeos foi medida para os *time-points* 48h (A,B) e 72h (A,C) após a transfecção, com o tempo de incubação da placa com os reagentes MTS/PMS de 1h. Os valores apresentados correspondem à média de 3 ensaios independentes e realizados nas mesmas condições. As barras de erro indicam o desvio padrão. Os dados foram analisados pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e os valores de $P < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos. Não foram observadas diferenças significativas entre as viabilidades para os três plasmídeos ($P > 0,05$).

Os resultados dos ensaios de viabilidade celular mostraram que, as células TPC-1 transfectadas com os plasmídeos pcDNA3 WT, pcDNA3 vazio e pcDNA3 MUT não apresentavam diferenças na viabilidade estatisticamente significativas ($P > 0,05$). Tal observou-se, tanto para o *time-point* 48 horas após a transfecção como para o *time-point* 72 horas após a transfecção, incubando as placas durante 1h, 2h e 3h com a mistura MTS/PMS (resultados apresentados apenas para incubação de 1h).

Estes resultados poderiam sugerir que a variante p.T22I no gene *C8orf48* não teria efeitos na viabilidade celular. No entanto, para que estes resultados fossem conclusivos, analisou-se a eficiência das transfecções transientes das células TPC-1 com os diferentes plasmídeos, por qRT-PCR (ponto 3.4 dos Resultados).

3.4 Quantificação por qRT-PCR do nível de expressão do gene *C8orf48* nas células TPC-1 transfectadas de forma transiente com construções derivadas do plasmídeo pcDNA3NeoMyc

A expressão do gene *C8orf48* nas células TPC-1 transfectadas com os diferentes plasmídeos foi analisada por qRT-PCR. Para este estudo utilizou-se o RNA de células TPC-1 transfectadas com as construções derivadas do plasmídeo pcDNA3NeoMyc (pcDNA3 vazio, pcDNA3 MUT e pcDNA3 WT), provenientes de um ensaio de viabilidade.

Os níveis de expressão relativos do gene *C8orf48* nas várias amostras foram normalizados em relação aos níveis de expressão do gene *PGK1* (controlo endógeno) (Figura III.23).

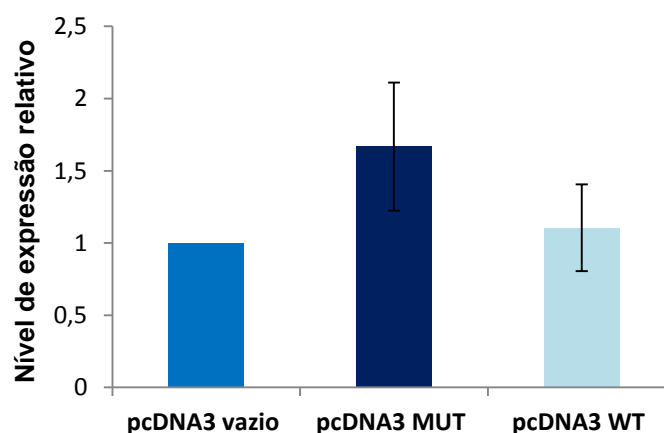


Figura III.23 - Níveis de expressão relativos do gene *C8orf48* nas células transfectadas com os plasmídeos pcDNA3 vazio, pcDNA3 MUT e pcDNA3 WT. Os níveis de expressão destes genes foram determinados por qRT-PCR e normalizados em relação aos níveis de expressão do controlo endógeno *PGK1*. Os níveis de expressão do gene *C8orf48* foram analisados em relação ao pcDNA3 vazio. Os valores apresentados correspondem à média de duplicados.

As células TPC-1 transfectadas com o plasmídeo pcDNA3 MUT apresentavam um nível de expressão relativo do gene *C8orf48* superior àquelas transfectadas com os plasmídeos pcDNA3 vazio e pcDNA3 WT. No entanto, os níveis de expressão do *C8orf48* tanto nas células transfectadas com o plasmídeo mutante como naquelas transfectadas com o plasmídeo *wild type*

apresentavam desvios padrões elevados, possivelmente porque as quantificações foram realizadas apenas com duplicados.

3.5 Sequenciação do gene *C8orf48* dos diferentes cDNAs amplificados por qRT-PCR

Para determinar se as células TPC-1 tinham sido transfectadas pelos diferentes plasmídeos e se as formas WT (pcDNA3 WT) e MUT (pcDNA3MUT) do gene *C8orf48* exógeno estavam a ser expressas nestas células, realizou-se a sequenciação do gene *C8orf48* nos respectivos cDNAs.

A análise dos resultados de sequenciação revelou que, as células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3 MUT não apresentavam expressão do gene *C8orf48* com a mutação c.65C>T, apenas apresentavam a expressão do gene *C8orf48* endógeno (sem a mutação). As células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3 WT apresentavam expressão do gene *C8orf48* *wild type*, mas o nível de expressão deste resultava provavelmente da sua expressão endógena e não da sua expressão exógena, pois era muito próximo do que foi observado nas células transfectadas com o plasmídeo vazio, que apresentava apenas a expressão do gene *C8orf48* endógeno, tal como esperado (Figura III.24).

Estes resultados sugerem que a eficiência de transfecção foi baixa e que esta metodologia requer futura optimização.

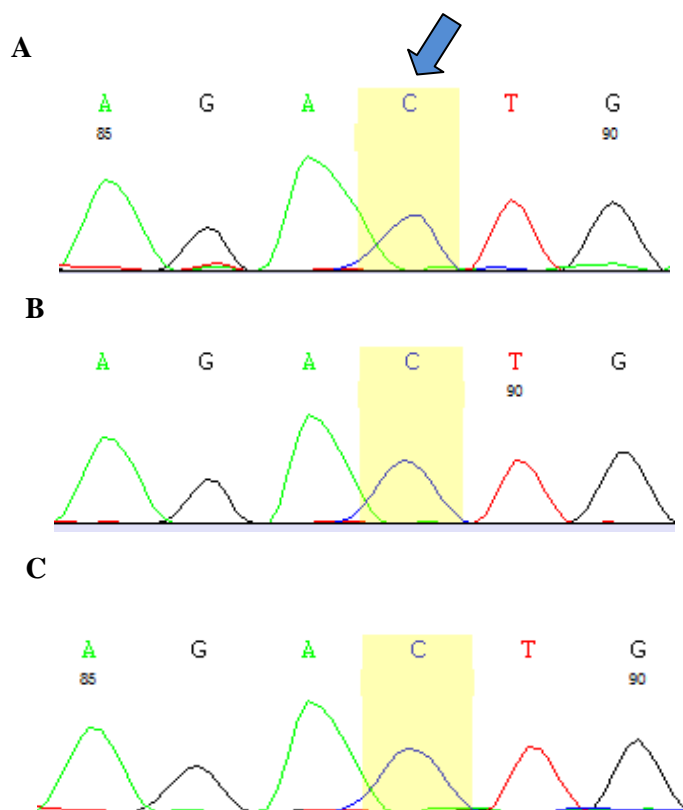


Figura III.24 - Sequenciação do gene *C8orf48* em células TPC-1 transfectadas com os plasmídeos pcDNA3 WT (A), pcDNA3 MUT (B) e pcDNA3 vazio (C). Nas células transfectadas com os diferentes plasmídeos, foi detectada apenas a expressão da sequência *wild type* do gene *C8orf48* (c.65C).

IV. DISCUSSÃO

O cancro da tiróide é a neoplasia mais comum do sistema endócrino e representa cerca de 1% de todos os tumores a nível mundial (Landa e Robledo, 2011). Os carcinomas não-medulares da tiróide (NMTC) têm origem a partir das células foliculares da tiróide e representam aproximadamente 90% dos tumores que ocorrem na glândula tiroideia (DeLellis, 2006). Cerca de 5% dos casos de NMTC ocorrem num *background* de predisposição familiar, designando-se de FNMTC (Malchoff e Malchoff, 2006; Bonora *et al.*, 2010).

Análises de *linkage*, utilizando famílias numerosas com múltiplos membros afectados, identificaram 8 regiões cromossómicas diferentes (1p13.2-1q22; 1q21; 2q21; 6q22; 8p23.1-p22; 8q24; 14q31 e 19p13.2), em que se localizam genes de susceptibilidade para o FNMTC (Malchoff *et al.*, 2000; Suh *et al.*, 2009; McKay *et al.*, 2001; Cavaco *et al.*, 2008b; He *et al.*, 2009; Bignell *et al.*, 1997; Canzian *et al.*, 1998; Landa e Robledo, 2011). No entanto, até à data, foi apenas identificado um gene de susceptibilidade para o FNMTC, o gene *DICER1*, localizado no *locus* 14q31 (Frio *et al.*, 2011). O envolvimento de diferentes *loci* de susceptibilidade sugere a existência de heterogeneidade genética para o FNMTC (Cavaco *et al.* 2008b; Pereira *et al.*, 2013).

Num estudo realizado por Ngan e colaboradores, foi identificado um outro gene envolvido na susceptibilidade para o FNMTC, o gene *NKX2-1* (Ngan *et al.*, 2009). Neste estudo, foi identificada uma mutação germinal missense (1016C>T; p.A339V) no gene *NKX2-1* em 4 doentes não relacionados, dois dos quais pertenciam a famílias que apresentavam MNG e PTC (Ngan *et al.*, 2009). O gene *NKX2-1* localiza-se na região cromossómica 14q13.3 e codifica o factor de transcrição NKX2-1, que é crucial para a diferenciação tiroideia (Ngan *et al.*, 2009).

Recentemente, num estudo realizado no nosso grupo, o gene *FOXE1* que também codifica um factor de transcrição envolvido na diferenciação tiroideia, foi proposto como gene de susceptibilidade para o FNMTC (Pereira *et al.*, 2013). No referido estudo, identificou-se uma variante germinal no gene *FOXE1* (c.743C>G; p.A248G) numa família com FNMTC e num caso aparentemente esporádico de NMTC (Pereira *et al.*, 2013).

A identificação de genes de susceptibilidade para o FNMTC pode ser realizada utilizando diferentes estratégias, entre elas encontram-se o mapeamento genético por análise de *linkage*, a pesquisa directa de mutações em genes candidatos e as tecnologias de próxima geração, nomeadamente a sequenciação global do exoma.

- **Estudo do gene *DICER1* em famílias com FNMTC, FMNG, NMTC e MNG e num caso isolado de MNG associado a tumor do ovário**

A identificação do *locus* de susceptibilidade para o FNMTC 14q31, foi inicialmente realizada numa grande família Canadiana que possuía 18 casos de MNG e alguns casos de NMTC (Bignell *et al.*, 1997). Recentemente, Frio e colaboradores identificaram nesta família

uma mutação germinal *missense* no gene *DICER1*, localizado na referida região de susceptibilidade (Frio *et al.*, 2011). Neste estudo, foram ainda identificadas mutações germinais no gene *DICER1* numa outra família com MNG e em 3 famílias que apresentavam MNG associado a tumores de células *Sertoli-Leydig* do ovário (SLTC) (Frio *et al.*, 2011).

Em estudos recentes, reportaram-se diferentes alterações genéticas no gene *DICER1* potencialmente patogénicas. Mutações germinais no gene *DICER1* foram identificadas em 11 famílias com blastoma pleuropulmonar (PPB). Algumas destas famílias também apresentavam casos de MNG e de tumores das gónadas (Hill *et al.*, 2009; Frio *et al.*, 2011). Num outro estudo realizado por Heravi-Moussavi e colaboradores foram identificadas várias mutações somáticas no gene *DICER1* em diferentes tipos de tumores do ovário: tumores de células *Sertoli-Leydig* (60%; 26/43), tumores de células da granulosa juvenil (7%; 1/14) e tumores de saco vitelino (13%; 2/15) (Heravi-Moussavi *et al.*, 2012).

A *DICER1* pertence à família das RNases III, e está envolvida no processamento de micro-RNAs (miRNAs) (Vermeulen *et al.*, 2005). Os miRNAs são pequenos RNAs que regulam negativamente a expressão dos genes a nível pós-transcricional (Frezzeti *et al.*, 2011).

No presente projecto de Mestrado, estudou-se o gene *DICER1* em 15 famílias: 7 destas apresentavam FNMTC, 4 apresentavam FMNG e 4 apresentavam casos de NMTC e/ou de MNG (não preenchendo os critérios para pertencer aos primeiros dois grupos de famílias). Estudou-se este gene também numa doente que apresentava MNG associado a tumor das células lipóides do ovário. Neste estudo, foram apenas identificadas variantes intrónicas no gene *DICER1*, sendo que 2 destas variantes eram polimorfismos: rs11624081 (c.2145+43C>T) e rs1778057 (c.4444+9G>T); e as outras 5 variantes ainda não foram descritas nas bases de dados NCBI ou ENSEMBL, com a presente nomenclatura: c.4444+11delGT, c.4444+11delGTGT, c.4444+11delGTGTGT, c.4444+11delGTGTGTGTGTGTGT e c.4444+11delGTGTGTGTGTGTGTGTGT.

O polimorfismo rs11624081 (c.2145+43C>T) foi identificado em 4 probandos de famílias com FNMTC, em 2 probandos de famílias com FMNG, num probando de uma família com NMTC e/ou MNG e num caso de MNG associado a tumor das células lipóides do ovário (em 7 destes casos, a variante estava presente em heterozigotia). A frequência alélica da variante c.2145+43C>T foi de 28,1 % nos casos estudados. Ao passo que a frequência alélica desta variante numa série de 379 indivíduos da população Europeia foi de 11,2 %. O polimorfismo rs1778057 (c.4444+9G>T) foi detectado em todas as famílias estudadas, tanto em homozigotia como em heterozigotia. A frequência alélica desta variante foi de 90,6 % nos casos estudados, e na população Europeia (379 indivíduos), a sua frequência alélica foi de 79,3%.

A diferença das frequências alélicas dos polimorfismos rs11624081 e rs1778057 entre a população Europeia e as famílias estudadas nesta tese, poderá dever-se ao facto do número de indivíduos estudados na população Europeia ser consideravelmente superior àquele estudado

neste projecto. O estudo de uma série mais extensa de casos familiares com lesões tiroideias poderá esclarecer este ponto.

[illegible]

Os resultados obtidos até à data, do estudo do gene *DICER1* sugerem que mutações neste gene são pouco frequentes em FNMTc, FMNG e em casos de NMTC e/ou MNG na população Portuguesa. Existem no entanto, diferentes factores que poderão ter contribuído para não terem sido identificadas variantes patogénicas no gene *DICER1*. Por exemplo, na selecção fenotípica das famílias, apenas uma delas apresentava tumores das células *Sertoli-Leydig* do ovário e nenhuma apresentava blastoma pleuropulmonar. Como foi já referido, mutações no gene *DICER1* são mais frequentes em casos de tumores *Sertoli-Leydig* do ovário esporádico ou familiar, ou em casos de blastoma pleuropulmonar familiar, associados ou não a MNG, tendo apenas sido detectadas em 2 famílias com FMNG ou FNMTc (Frio *et al.*, 2011, Hill *et al.*, 2009). Acresce que, 4 das famílias estudadas, embora apresentassem diversos casos com lesões tiroideias, não preenchiam a totalidade dos critérios para serem classificadas como FMNG ou FNMTc.

No que diz respeito às famílias que foram estudadas nesta tese, que cumpriam os critérios para FMNG e não apresentaram alterações no gene *DICER1* (previamente designado por *locus* de susceptibilidade *MNG1*), é possível que estejam envolvidos outros *loci* de susceptibilidade (genes) na sua etiologia, como passamos a descrever:

a) o *locus* de susceptibilidade *MNG2* foi mapeado no cromossoma Xp22 por Capon e colaboradores (Capon *et al.*, 2000). Este *locus* foi identificado numa família Italiana com 3 gerações, na qual 10 mulheres e 2 homens apresentavam MNG. (Capon *et al.*, 2000);

b) num outro estudo, realizado por Takahashi e colaboradores, foram estudadas 2 famílias Japonesas não-relacionadas constituídas por várias gerações com MNG, eutiroidismo e níveis elevados de TSH no sangue (Takahashi *et al.*, 2001). As análises de *linkage* das 2 famílias mapearam um único *locus*, de forma independente, no cromossoma 3q26.1-1q26.3, que foi designado de *MNG3* (Takahashi *et al.*, 2001).

c) Bayer e colaboradores realizaram análises de *linkage* globais do genoma, para detectar novos *loci* de susceptibilidade para o MNG, utilizando 450 marcadores de microssatélites em 18 famílias Dinamarquesas, Alemãs e Eslovacas (Bayer *et al.*, 2004). Nestes estudos, os investigadores identificaram quatro novos *loci* candidatos para o FMNG nos cromossomas 2q, 3p, 7q e 8p (Bayer *et al.*, 2004). Quatro das famílias estudadas apresentavam *linkage* para o *locus* 3p, enquanto que, para cada um dos *loci* 2q, 7q e 8p apenas foi encontrado *linkage* numa das famílias estudadas (Bayer *et al.*, 2004).

Deste modo, futuramente, poderá efectuar-se uma selecção mais criteriosa das famílias para o estudo do gene *DICER1*, e estender este estudo a novas famílias com MNG associado a tumores de células *Sertoli-Leydig*, que venham a ser identificadas. Poderá também investigar-se se os *loci* de susceptibilidade *MNG2*, *MNG3*, e aqueles localizados nos cromossomas 2q, 3p, 7q e 8p, estão envolvidos na manifestação de bócio multinodular nas famílias com FMNG estudadas nesta tese. Poderá ainda realizar-se a pesquisa das alterações genéticas que estão na base da manifestação das lesões tiroideias nestas famílias, através da sequenciação global do exoma. A análise do exoma será também importante nas famílias com FNMTc e nas famílias com NMTC/MNG com uma elevada frequência de outras neoplasias não tiroideias.

- **Estudo funcional da variante p.T22I do gene *C8orf48* identificada numa família com FNMTc (família 1)**

Num estudo inicial da família 1, o nosso grupo mapeou um novo *locus* de susceptibilidade para o FNMTc, na região cromossómica 8p23.1-p22, denominado de *FTEN* (*Familial Thyroid Epithelial Neoplasia*) (Cavaco *et al.*, 2008b). Posteriormente, num estudo também desenvolvido pelo nosso grupo, que envolveu a sequenciação global do exoma, foi identificada uma nova variante (c.65C>T, p.T22I) no gene *C8orf48* num doente da família 1 (Pereira, 2012).

O estudo de segregação nesta família, revelou que, para além do probando, 15 familiares (13 dos quais com lesões tiroideias) também apresentavam a variante c.65C>T no gene *C8orf48* (Pereira, 2012). Quando esta variante foi detectada em 2012, ainda não se encontrava descrita nas bases de dados NCBI ou ENSEMBL. No entanto, esta foi recentemente descrita no ENSEMBL, tendo sido identificada num indivíduo, no estudo de uma população de 285 descendentes de Europeus. No entanto, a variante c.65C>T no gene *C8orf48* não estava presente em 50 controlos normais, assim sendo, não se trata de um polimorfismo comum na população Portuguesa (Pereira, 2012). Estes dados sugerem que poderá existir um efeito de fundador entre a família 1 e o indivíduo pertencente ao estudo de descendentes Europeus.

Pouco se sabe sobre o papel da proteína codificada pelo gene *C8orf48*. Na literatura, apenas foi descrita a interacção entre esta proteína e a proteína MDFI (Venkatesan *et al.*, 2009). A proteína MDFI estimula a via metabólica Wnt (esta via controla diferentes processos celulares, incluindo a proliferação celular), através da ligação ao complexo formado pela axina, bloqueando-o. Desta forma, a β -catenina fica livre e desloca-se para o núcleo, local onde activa a transcrição de diferentes genes-alvo (Komiya e Habas, 2008; MacDonald *et al.*, 2009). Numa análise de *micro-arrays* de oligonucleótidos, realizada anteriormente pelo nosso grupo, observou-se que os genes-alvo da β -catenina, *CLDN1*, *CD44*, *CCND1* e *MYC*, se encontravam sobre-expressos no tumor da tiróide (comparativamente com tiróide normal) do probando da família 1, o que poderia resultar do efeito da variante no gene *C8orf48*. No entanto, este tumor também apresentava uma mutação somática no gene *BRAF*, que poderá igualmente contribuir para o aumento de expressão dos referidos genes-alvo (Pereira, 2012).

No presente projecto de Mestrado, pretendeu-se desenvolver o estudo funcional dos potenciais efeitos oncogénicos da variante p.T22I do gene *C8orf48*, identificada na família 1. Para tal, inicialmente, estudou-se a segregação da variante rs201250059 (c.65C>T, p.T22I) e de 2 polimorfismos do gene *C8orf48*: rs13273355 (c.83C>T) e rs11203497 (c.853T>A) na família 1. O estudo de segregação nesta família mostrou que o haplotipo TCA para as variantes rs201250059, rs13273355 e rs11203497 estava presente em indivíduos afectados com lesões da tiróide, e em dois familiares jovens (III.32 e III.33), que não apresentavam doença tiroideia.

O estudo de haplotipos nesta família permitiu definir a sequência do gene *C8orf48* nos indivíduos afectados, que foi utilizada na subclonagem e mutagénesse dirigida, para preparação dos vectores a utilizar nos estudos funcionais. Realizou-se a construção de dois plasmídeos: o plasmídeo que expressava o gene *C8orf48 wild type* (pcDNA3 WT) e o plasmídeo que expressava a variante c.65C>T (pcDNA3 MUT), que foi obtido através da mutagénesse dirigida do plasmídeo anterior. Para averiguar o papel da variante p.T22I do gene *C8orf48* na tumorigénese da tiróide desenvolveram-se estudos funcionais preliminares, utilizando uma linha celular de carcinoma papilar da tiróide (TPC-1). Realizou-se a transfecção transiente de células

TPC-1 com os seguintes plasmídeos: pcDNA3 WT, pcDNA3 MUT e pcDNA3 vazio. As células transfectadas foram utilizadas em ensaios de viabilidade.

Nos ensaios de viabilidade não se observaram diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$) na viabilidade das células transfectadas com os 3 plasmídeos, tanto para o *time-point* de 48 horas após a transfecção, como para o *time-point* de 72 horas após a transfecção, mesmo utilizando diferentes tempos de incubação (1h, 2h e 3h) das placas com a mistura MTS/PMS. Para investigar se a ausência de efeito da variante c.65C>T na viabilidade poderia estar relacionada com uma baixa eficiência de transfecção, realizou-se um qRT-PCR para quantificar o nível de expressão do gene *C8orf48* nas células transfectadas com os diferentes plasmídeos. Observou-se que, apesar das células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3 MUT apresentarem uma expressão do gene *C8orf48* superior àquela expressa pelas células transfectadas com os plasmídeos pcDNA3 WT e pcDNA3 vazio, os desvios padrões eram elevados, não sendo os resultados desta análise conclusivos. A utilização de triplicados no qRT-PCR poderá melhorar a precisão do ensaio.

Uma outra abordagem para avaliar a eficiência das transfecções atrás referidas, consistiu na sequenciação dos cDNAs obtidos a partir dos RNAs extraídos de células TPC-1, transfectadas com diferentes plasmídeos. Observou-se que as células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3 MUT, apenas expressavam o gene *C8orf48* endógeno (não-mutado). Estes resultados indicaram que a eficiência das transfecções foi muito reduzida.

Em suma, a construção dos plasmídeos constituiu uma etapa crucial, para a subsequente realização de estudos funcionais. No entanto, problemas técnicos, resultaram numa baixa eficiência das transfecções transientes comprometendo os ensaios de viabilidade realizados.

Para prosseguir o estudo do papel da variante c.65C>T do gene *C8orf48* na tumorigénese da tiróide será fundamental avaliar a eficiência das transfecções transientes. Várias abordagens poderão ser seguidas: a) quantificação da expressão da proteína codificada pelo gene *C8orf48*, por qRT-PCR e *Western blot*; b) utilização de um plasmídeo que codifique uma proteína que acople a EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) à *C8orf48*; c) co-transfecção com um plasmídeo de expressão, com um gene que codifica a proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*) sob o controlo do *enhancer* de citomegalovirus/promotor de β -actina de galinha (pcAGGS-AFP) (Silva, 2011).

Para dar continuidade ao estudo do efeito da variante c.65C>T do gene *C8orf48*, será ainda importante preparar transfecções estáveis dos diferentes plasmídeos. Neste tipo de transfecções o DNA plasmídico é integrado no genoma das células. Para obter uma população celular homogénea transfectada de forma estável, é transfectado juntamente com o gene de interesse, um gene que é um marcador selectivo (normalmente um gene de resistência a um antibiótico). Nas transfecções estáveis, as células integram uma ou um número de cópias reduzido do DNA plasmídico, e embora dependa da sequência do DNA e do tipo de células, o DNA transfectado é

habitualmente expresso durante longos períodos de tempo. As transfecções estáveis permitem deste modo estabelecer *pools* celulares, em que o gene de interesse é inserido no genoma das células e expresso permanentemente. Deste modo, como trabalho futuro poderá realizar-se a preparação de *pools* de células TPC-1 com expressão estável das diferentes construções derivadas do plasmídeo pcDNA3NeoMyc. A utilização de *pools* celulares, poderá também ser vantajosa, pois diferenças na integração dos plasmídeos poderão ser compensadas entre as várias células que constituem a *pool*. A utilização de *pools* permite, também obter um modelo mais aproximado do nicho celular existente num tumor, uma vez que são células que apresentam características heterogéneas (Pereira, 2012).

Futuramente, será também importante desenvolver novos ensaios funcionais, nomeadamente, ensaios de proliferação celular (através da contagem celular directa em hemocitómetro, ou através da análise da incorporação de 5-bromo-2'-desoxiuridina no DNA durante a replicação celular); ensaios de migração celular através do ensaio de *wound healing*; ensaios para determinar o efeito da variante no ciclo celular e na apoptose celular (através de citometria de fluxo). Poderão ainda realizar-se estudos por qRT-PCR de expressão de potenciais genes-alvo do *C8orf48*, nomeadamente genes-alvo da via Wnt, *e.g.* *CLDN1*, *CD44*, *CCND1* e *MYC*.

Conclusões

No presente projecto de Mestrado, realizou-se o estudo do gene *DICER1* em famílias com FNMTc, FMNG, com casos de NMTC e/ou MNG e ainda, numa doente com MNG associado a tumor das células lipóides do ovário. Os estudos do gene *DICER1* nestas famílias conduziram à identificação de 7 polimorfismos intrónicos: rs11624081 (c.2145+43C>T), rs1778057 (c.4444+9G>T), c.4444+11delGT, c.4444+11delGTGT, c.4444+11delGTGTGT, c.4444+11delGTGTGTGTGTGTGT e c.4444+11delGTGTGTGTGTGTGTGT.

A ausência de alterações potencialmente patogénicas no gene *DICER1* sugere que outros genes localizados em *loci* de susceptibilidade mapeados ou ainda por identificar, poderão estar envolvidos na etiologia das lesões tiroideias nas famílias estudadas. A utilização da sequenciação da próxima geração (sequenciação global do exoma) poderá ser uma estratégia importante para esclarecer a base molecular destes casos familiares.

Na segunda parte deste projecto, estudou-se uma variante rara (c.65C>T; p.T22I) do gene *C8orf48* identificada por sequenciação global do exoma num estudo anterior realizado pelo nosso grupo, numa família com FNMTc. Para investigar o efeito desta variante na tumorigénese da tiróide realizou-se a construção de dois plasmídeos: o plasmídeo que expressava o gene *C8orf48 wild type* (pcDNA3 WT), e o plasmídeo que expressava a variante c.65C>T (pcDNA3 MUT). Os plasmídeos construídos foram utilizados em transfecções transientes para estudo do efeito da variante na viabilidade celular. Estes ensaios funcionais representaram, no entanto, uma fase inicial do estudo do efeito da variante c.65C>T. Futuramente, para esclarecer o papel desta variante, deverão preparar-se *pools* celulares com expressão estável dos diferentes plasmídeos e realizar-se novos ensaios funcionais, nomeadamente, ensaios de proliferação, migração, apoptose e do ciclo celular.

O estudo de novos genes candidatos para a susceptibilidade para o FNMTc e FMNG deverá ser continuado, uma vez que a identificação destes genes permitirá identificar atempadamente os portadores de mutações, realizar um aconselhamento genético apropriado, e identificar novos alvos terapêuticos para as neoplasias familiares da tiróide.

V. BIBLIOGRAFIA

Bayer Y, Neumann S, Meyer B, Rüschendorf F, Reske A, Brix T, Hegedüs L, Langer P, Nürnberg P, Paschke R (2004) Genome-Wide Linkage Analysis Reveals Evidence for Four New Susceptibility Loci for Familial Euthyroid Goiter. *J Clin Endocrinol Metab* **89**:4044-4052

Bignell GR, Canzian F, Shayeghi M, Stark M, Shugart YY, Biggs P, Mangion J, Hamoudi R, Rosenblatt J, Buu P, Sun S, Stoffer SS, Goldgar DE, Romeo G, Houlston RS, Narod SA, Stratton MR, Foulkes WD (1997) Familial Nontoxic Multinodular Thyroid Goiter Locus Maps to Chromosome 14q but Does Not Account for Familial Nonmedullary Thyroid Cancer. *Am J Hum Genet* **61**: 1123-1130

Bonora E, Tallini G, Romeo G (2010) Genetic predisposition to familial nonmedullary thyroid cancer: an update of molecular findings and state-of-the-art studies. *J Oncol* **2010**: 1-7

Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW (2005) Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *J Mol Endocrinol* **34**: 597-601

Capezzone M, Marchisotta S, Cantara S, Busonero G, Brilli L, Pazaitou-Panayiotou K, Carli AF, Caruso G, Toti P, Capitani S, Pammolli A, Pacini F (2008) Familial non-medullary thyroid carcinoma displays the features of clinical anticipation suggestive of a distinct biological entity. *Endocr Relat Cancer* **15**: 1075-1081

Capon F, Tacconelli A, Giardina E, Sciacchiato S, Bruno R, Tassi V, Trischitta V, Filetti S, Dallapiccola B, Novelli G (2000) Mapping a Dominant Form of Multinodular Goiter to Chromosome Xp22. *Am J Hum Genet* **67**:1004–1007

Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, Magalhães J, Roque V, Trovisco V, Vieira de Castro I, Cardoso-de-Oliveira M, Fonseca E, Soares P, Sobrinho-Simões M (2006) PAX8-PPAR γ Rearrangement Is Frequently Detected in the Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **91**: 213-220

Cavaco BM, Batista PF, Martins C, Banito A, do Rosário F, Limbert E, Sobrinho LG, Leite V (2008a) Familial non-medullary thyroid carcinoma (FNMTTC): analysis of FPTC/PRN, NMTC1, MNG1 and TCO susceptibility loci and identification of somatic BRAF and RAS mutations. *Endocr Relat Cancer* **15**: 207–215

Cavaco BM, Batista PF, Sobrinho LG, Leite V (2008b) Mapping a New Familial Thyroid Epithelial Neoplasia Susceptibility Locus to Chromosome 8p23.1-p22 by High Density Single-Nucleotide Polymorphism Genome-Wide Linkage Analysis. *J Clin Endocrinol Metab* **93**: 4426-4430

Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL (1983) Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* **305**: 779-784

Chen JF, Murchison EP, Tang Ruhang, Callis TE, Tatsuguchi M, D Zhongliang, Rojas M, Hammond SM, Schneider MD, Selzman CH, Meissner G, Patterson C, Gregory J. Hannon, Wang DZ (2008) Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *PNAS* **105**: 2111-2116

Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P, Nayir A, Bakkaloglu A, Ozen S, Sanjad S, Nelson-Williams C, Farhi A, Mane S, Lifton R (2009) Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *PNAS* **106**: 19096-19101

Croce CM (2008) Molecular origins of cancer. *N Eng J Med* **358**: 502-511

Dang CV (2010) Glutaminolysis - Supplying carbon or nitrogen or both for cancer cells? *Cell Cycle* **9**: 3884-3886

De Falco V, Giannini R, Tamburrino A, Ugolini C, Lupi C, Puxeddu E, Santoro M, Basolo F. (2008) Functional Characterization of the Novel T599I-VKSRdel BRAF Mutation in a Follicular Variant Papillary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **93**: 4398-4402

DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C (2004) *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs*. Lyon, França: IARC Press

DeLellis RA (2006) Pathology and genetics of thyroid carcinoma. *J Surg Oncol* **94**: 662-669

Duroux-Richard I, Jorgensen C, Apparailly F (2011) miRNAs and rheumatoid arthritis – promising novel biomarkers. *Swiss Med Wkly* **141**: 1-6

Dvorakova S, Vaclavikova E, Sykorova V, Vcelak J, Novak Z, Duskova J, Ryska A, Laco J, Cap J, Kodetova D, Kodet R, Krskova L, Vlcek P, Astl J, Vesely D, Bendlova B (2008) Somatic Mutations in the *RET* proto-oncogene in Sporadic Medullary Thyroid Carcinomas. *Mol Cell Endocrinol* **284**: 21-27

Erlich HA (1989) Polymerase Chain Reaction. *J Clin Immunol* **9**: 437-447

Forgacs E, Wren JD, Kamibayashi C, Kondo M, Xu XL, Markowitz S, Tomlinson GE, Muller CY, Gazdar AF, Garner HR, Minna JD (2001) Searching for microsatellite mutations in coding regions in lung, breast, ovarian and colorectal cancers. *Oncogene* **20**: 1005-1009

Frezza D, Reale C, Cali G, Nitsch L, Fagman H, Nilsson O, Scarfò M, De Vita G, Di Lauro R (2011) The microRNA-Processing Enzyme Dicer Is Essential for Thyroid Function. *PLOS ONE* **6**: 1-10

Frio TR, Bahubeshi A, Kanellopoulou C, Hamel N, Niedziela M, Sabbaghian N, Pouchet C, Gilbert L, O'Brien PK, Serfas K, Broderick P, Houlston RS, Lesueur F, Bonora E, Muljo S, Schimke RN, Soglio DB, Arseneau J, Schultz KA, Priest JR, Nguyen V, Harach HR, Livingston DM, Foulkes WD, Tischkowitz M (2011) *DICER1* Mutations in Familial Multinodular Goiter With and Without Ovarian Sertoli-Leydig Cell Tumors. *JAMA* **305**: 68-77

Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, Davies H, Teague J, Butler A, Stevens C, Edkins S, O'Meara S, Vastrik I, Schmidt EE, Avis T, Barthorpe S, Bhamra G, Buck G, Choudhury B, Clements J, Cole J, Dicks E, Forbes S, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Hinton J, Jenkinson A, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Tofts C, Varian J, Webb T, West S, Widaa S, Yates A, Cahill DP, Louis DN, Goldstraw P, Nicholson AG, Brasseur F, Looijenga L, Weber BL, Chiew Y, DeFazio A, Greaves MF, Green AR, Campbell P, Birney E, Easton DF, Chenevix-Trench G, Tan M, Khoo SK, Teh BT, Yuen ST, Leung SY, Wooster R, Futreal PA, Stratton MR (2007) Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* **446**: 153-158

Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70

- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646-674
- Harfe BD, McManus MT, Mansfield JH, Hornstein E, Tabin CJ (2005) The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb. *PNAS* **102**: 10898-10903
- Harland M, Mistry S, Bishop D, Bishop J (2001) A deep intronic mutation in CDKN2A is associated with disease in a subset of melanoma pedigrees. *Hum Mol Genet* **10**: 2679-2686
- Harris KS, Zhang Z, McManus MT, Harfe BD, Sun X (2006) Dicer function is essential for lung epithelium morphogenesis. *PNAS* **103**: 2208-2213
- Harvey SJ, Jarad G, Cunningham J, Goldberg S, Schermer B, Harfe BD, McManus MT, Benzing T, Miner JH (2008) Podocyte-Specific Deletion of Dicer Alters Cytoskeletal Dynamics and Causes Glomerular Disease. *J Am Soc Nephrol* **19**: 2150-2158
- He H, Nagy R, Liyanarachchi S, Jiao H, Li W, Suster S, Kere J, de la Chapelle A (2009) A Susceptibility Locus for Papillary Thyroid Carcinoma on Chromosome 8q24. *Cancer Res* **69**: 625-631
- Hegedus L, Bonnema SJ, Bennedbaek FN (2003) Management of Simple Nodular Goiter: Current Status and Future Perspectives. *Endocr Rev* **24**: 102-132
- Heravi-Moussavi A, Anglesio MS, Cheng SW, Senz J, Yang W, Prentice L, Fejes AP, Chow C, Tone A, Kalloger SE, Hamel N, Roth A, Ha G, Wan AN, Maines-Bandiera S, Salamanca C, Pasini B, Clarje BA, Lee AF, Lee C, Zhao C, Young RH, Aparicio SA, Sorensen PH, Woo MM, Boyd N, Jones SJ, Hirst M, Marra M, Gilks B, Shah S, Foulkes W, Morin G, Huntsman D (2012) Recurrent Somatic *DICER1* Mutations in Nonepithelial Ovarian Cancers. *N Engl J Med* **366**: 234-242
- Hill DA, Ivanovich J, Priest JR, Gurnett CA, Dehner LP, Desruisseau D, Jarzembowski JA, Wikenheiser-Brokamp KA, Suarez BK, Whelan AJ, Williams G, Bracamontes D, Messinger Y, Goodfellow PJ (2009) *DICER1* Mutations in Familial Pleuropulmonary Blastoma. *Science* **325**: 965
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego, EUA: Academic Press, Inc.
- Jones PA, Laird PW (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nat Gen* **21**: 163-167
- Kawase-Koga Y, Otaegi G, and Sun T (2009) Different timings of Dicer deletion affect neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse central nervous system. *Dev Dyn* **238**: 2800-2812
- Knudson AG (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci* **68**: 820-823
- Komiya Y, Habas R (2008) Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* **4**: 68-75
- Kondo T, Ezzat S, Asa SL (2006) Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer* **6**: 292-306
- Krohn K, Fuhrer D, Bayer Y, Eszlinger M, Brauer V, Neumann S, Paschke R (2005) Molecular Pathogenesis of Euthyroid and Toxic Multinodular Goiter. *Endocr Rev* **26**: 504-524

- Kumar MS., Pester RE., Chen CY, Lane K, Chin C, Lu J., Kirsch DG, Golub TR, Jacks T (2009) Dicer1 functions as a haploinsufficient tumor suppressor. *Genes Dev* **23**: 2700-2704
- Lambertz I, Nittner D, Mestdagh P, Denecker G, Vandesompele J, Dyer MA, Marine JC (2010) Monoallelic but not biallelic loss of *Dicer1* promotes tumorigenesis *in vivo*. *Cell Death Differ* **17**: 633-641
- Landa I, Robledo M (2011) Association studies in thyroid cancer susceptibility: are we on the right track? *J Mol Endocrinol* **47**: R43-R58
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J (2004) *Molecular Cell Biology*, 5th edn. NY, EUA: W. H. Freeman
- Loh KC (1997) Familial nonmedullary thyroid carcinoma: a meta-review of case series. *Thyroid* **7**: 107-13
- MacDonald BT, Tamai K, He X (2009) Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Dev Cell* **17**: 9-26
- Magalhães JP, Finch CE, Janssens G (2010) Next-generation sequencing in aging research: emerging applications, problems, pitfalls and possible solutions. *Ageing Res Rev* **9**: 315-323
- Majewski J, Schwartzentruber J, Lalonde E, Montpetit A, Jabado N (2011) What can exome sequencing do for you?. *J Med Genet* **48**: 580-589
- Malchoff CD, Sarfarazi M, Tendler B, Forouhar F, Whalen G, Joshi V, Arnold A, Malchoff DM (2000) Papillary Thyroid Carcinoma Associated with Papillary Renal Neoplasia: Genetic Linkage Analysis of a Distinct Heritable Tumor Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **85**: 1758-1764
- Malchoff CD, Malchoff DM (2006) Familial Nonmedullary Thyroid Carcinoma. *Cancer Control* **13**: 106-110
- Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho LG, Leite V (2002) Expression of PAX8-PPAR γ Rearrangements in Both Follicular Thyroid Carcinomas and Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **87**: 3947-3952
- Moses W, Weng J, Kebebew E (2011) Prevalence, Clinicopathologic Features, and Somatic Genetic Mutation Profile in Familial Versus Sporadic Nonmedullary Thyroid Cancer. *Thyroid* **21**: 367-371
- Moura MM, Cavaco BM, Pinto AE, Leite V (2011) High prevalence of RAS mutations in RET-negative sporadic medullary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* **96**: E863-E868
- Muro-Cacho CA, Ku NN (2000) Tumors of the thyroid gland: histologic and cytologic features-part 1. *Cancer Control* **7**: 276-287
- Ngan ES, Lang BH, Liu T, Shum CK, So MT, Lau DK, Leon TY, Cherny SS, Tsai SY, Lo CY, Khoo US, Tam PK, Garcia-Barcelo MM (2009) A germline mutation (A339V) in thyroid transcription factor-1 (TTF-1/NKX2-1) in patients with multinodular goiter and papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **101**: 162-175

Nikiforov YE, Biddinger PW, Thompson LD (2012) *Diagnostic Pathology and Molecular Genetics of the Thyroid*, 2nd edn. Philadelphia, EUA: Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams and Wilkins

Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, DornII GW, Tallini G, Kroll TG, Nikiforov YE (2003) RAS Point Mutations and PAX8-PPAR γ Rearrangement in Thyroid Tumors: Evidence for Distinct Molecular Pathways in Thyroid Follicular Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **88**: 2318-2326

Nikiforova MN, Chiose SI, Nikiforov YE (2009) MicroRNA Expression Profiles in Thyroid Tumors. *Endocr Pathol* **20**: 85-91

Nuytemans K, Vance JM (2010) Whole exome sequencing. *Rinsho Shinkeigaku (Clinical neurology)* **50**: 952- 955

Patel KN, Shaha AR (2006) Poorly Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancer. *Cancer Control* **13**: 119-128

Pereira J (2012) Estudo do gene *FOXO1* e identificação de novos genes de susceptibilidade para o cancro da tiróide familiar. Tese de estágio do Mestrado de Genética Molecular e Biomedicina. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

Pereira J, Silva J, Tomaz R, Pinto A, Leite V, Cavaco B (2013) Identification of a novel germline *FOXO1* variant in patients with familial non-medullary thyroid carcinoma (FNMTTC).

Perez-Montiel MD, Suster S (2008) The spectrum of histologic changes in thyroid hyperplasia: a clinicopathologic study of 300 cases. *Hum Pathol* **39**: 1080-1087

Pita JM, Figueiredo IF, Moura MM, Leite V, Cavaco BM (2013) Cell cycle deregulation and *TP53* and *RAS* mutations are major events in poorly differentiated and undifferentiated thyroid carcinomas (submitted).

Rodriguez W, Jin L, Janssens V, Pierreux C, Hick A, Urizar E, Costagliola S (2012) Deletion of the RNaseIII Enzyme Dicer in Thyroid Follicular Cells Causes Hypothyroidism with Signs of Neoplastic Alterations. *PLOS ONE* **7**: 1-11

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491

Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vol. 2, 3rd edn. NY, EUA: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Sánchez LF, Morante TL, Azpiroz MM, Loscos AR (2010) *Endocrinología Clínica*, 2nd edn. Spain: Díaz de Santos.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467

Sastre-Perona A, Santisteban P (2012) Role of the Wnt pathway in thyroid cancer. *Front Endocrinol* **3**: 1-10

Sawth AN, Duchaine TF (2012) Turning Dicer on its head. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 365-366

- Shyr D, Liu Q (2013) Next generation sequencing in cancer research and clinical application. *Biological Procedures Online* **15**: 1-11
- Silva J (2011) Caracterização molecular e funcional de variantes genéticas em factores de transcrição da tiróide em formas familiares de cancro da tiróide. Tese de estágio do Mestrado de Biologia Humana e Ambiente. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.
- Spencer SL, Gerety RA, Pienta KJ, Forrest S (2006) Modeling somatic evolution in tumorigenesis. *PLOS Comput Biol* **2**: 0001-0009
- Spitzweg C, Morris JC (2002) Sodium Iodide Symporter (NIS) and Thyroid. *Hormones* **1**:22-34
- Stoddart MJ (2011) *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols*. Vol. 740, NY, EUA: Humana Press
- Suh I, Filetti S, Vriens MR, Guerrero MA, Tumino S, Wong M, Shen WT, Kebebew E, Duh Q, Clark OH (2009) Distinct loci on chromosome 1q21 and 6q22 predispose to familial nonmedullary thyroid cancer: A SNP array-based linkage analysis of 38 families. *Surgery* **146**: 1073-1080
- Takahashi T, Nozaki J, Komatsu M, Wada Y, Utsunomiya M, Inoue K, Takada G, Koizumi A (2001) A new locus for a dominant form of multinodular goiter on 3q26.1-q26.3. *Biochem Biophys Res Commun* **284**: 650-654
- Venkatesan K, Rual JF, Vazquez A, Stelzl U, Lemmens I, Hirozane-Kishikawa T, Hao T, Zenkner M, Xin X, Goh KI, Yildirim MA, Simonis N, Heinzmann K, Gebreab F, Sahalie JM, Cevik S, Simon C, de Smet AS, Dann E, Smolyar A, Vinayagam A, Yu H, Szeto D, Borick H, Dricot A, Klitgord N, Murray RR, Lin C, Lalowski M, Timm J, Rau K, Boone C, Braun P, Cusick ME, Roth FP, Hill DE, Tavernier J, Wanker EE, Barabási AL, Vidal M (2009) An empirical framework for binary interactome mapping. *Nat Methods* **6**: 83-90
- Vermeulen A, Behlen L, Reynolds A, Wolfson A, Marshall WS, Karpilow J, Khvorova A (2005) The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency. *RNA* **11**: 674-682
- Vogelstein B, Kinzler KW (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* **10**: 789-799
- Weinberg RA (1996) How cancer arises. *Sci Am* **275**: 62-70
- Xing M (2013) Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer* **13**: 184-19.
- Zardoya R, Vollmer DM, Craddock C, Streelman JT, Karl S, Meyer A (1996) Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving the phylogeny of cichlid fishes. *Proc R Soc Lond B* **263**, 1589-1598

ANEXOS

Tabela I - Sequências dos *primers* e condições de amplificação por PCR, utilizados no estudo do gene *DICER1*.

Gene <i>DICER1</i>	Nome do primer	Sequência (5'→3')	Tamanho do segmento (bp)	MgCl ₂ (mM)	Hibridação (°C)
Segmento 1	DICER1-2F	TTTGAATGGCTCATAGGAATG	400	1,8	58
	DICER1-2R	GAGGCCTGAAAGGGTAAATG			
Segmento 2	DICER1-5F	CCTCACTTATGATACAATGGCTCT	357	1,8	58
	DICER1-5R	TCATACACTGCAGCCAAACTC			
Segmento 3	DICER1-9F	GACCAAGACCGTTTTGTTAGG	415	1,5	58
	DICER1-9R	ATGGGGACAGCTGGTCTAATA			
Segmento 4	DICER1-10F	AATGCCCAAGAGCATGTGT	485	1,5	58
	DICER1-10R	CCTCTTTTGAGATTATTGCCTGT			
Segmento 5	DICER1-11F	AGGTACAGAGGCAGACAGCAT	325	1,9	58
	DICER1-11R	CTGGTAACCGCAAATGTCA			
Segmento 6	DICER1-12F	GCACATGACAAATCAAACCTCG	297	1,8	58
	DICER1-12R	TGCAAGTCTTAGAAAAGCTGAAA			
Segmento 7	DICER1-13F	GGCAGTGGTTTCATAGGTGT	291	1,8	58
	DICER1-13R	CCAAAGCACATTAAGATCAGC			
Segmento 8	DICER1-14F	ACTTTTCCAGGTCCTTCTAACA	300	1,8	59
	DICER1-14R	TGATGTAGCGGAAAACAAAGT			
Segmento 9	DICER1-15F	TGTTTTCTTGCTGACATCTGG	383	1,8	58
	DICER1-15R	GAAGAGGCACCTCGATCTTTA			
Segmento 10	DICER1-16-17F	GGTGCCTCTTCTATTTCTCCA	663	1,5	59
	DICER1-16-17R	CCCGACCTAGTGCATCTTTT			
Segmento 11	DICER1-19F	TTCAGGTGGTTTTTGGAGAA	289	1,5	59
	DICER1-19R	CGAATCATGCATTTAACTTGG			
Segmento 12	DICER1-20F	CCATTGGCCTTAGAGGATT	393	1,8	59
	DICER1-20R	GTTCTTTTGCAAACAGGATCTC			
Segmento 13	DICER1-22F	CTGAGGATATGTTAATATGCCTT	319	1,8	59
	DICER1-22R	TTATTTGGCTCACCGAAAAG			

Tabela II - Sequências dos *primers* e condições de amplificação por PCR, utilizados no estudo do gene *C8orf48*.

Gene <i>C8orf48</i>	Nome do primer	Sequência (5'→3')	Tamanho do segmento (bp)	MgCl ₂ (mM)	Hibridação (°C)
Segmento 1	C8orf48-1F	GTCTTAACCTGGGCAAAGGA	231	1,2	58
	C8orf48-1R	AGTCTGCTTTTCCCTCTCCA			
Segmento 2	C8orf48-2F	TTCCAGCTCATTCAGCTCCT	453	1,5	58
	C8orf48-2R	GGCGTTGTCCTCATGTTTTT			
Segmento 3	C8orf48-3F	ACCCGATGAACTTTTGAACA	480	1,2	58
	C8orf48-3R	CACAACAAAGACATCTATCCACA			

Tabela III - Sequências dos *primers* e condições de amplificação por PCR, utilizados na amplificação do *insert C8orf48*.

Gene <i>C8orf48</i>	Nome do primer	Sequência (5'→3')	Tamanho do segmento (bp)	MgCl ₂ (mM)	Hibridação (°C)
Segmento 1	C8orf48-F-cDNA	CGCGGATCCCCTGATGCAT TGTGATGG	992	1,8	56
	C8orf48-R2-cDNA	CCGGAATTCTTACACATTA TCATTAACAATGACC			

Tabela IV – Sequências dos *primers* e condições de amplificação por PCR, utilizados na mutagenese dirigida do *insert C8orf48*.

Gene <i>C8orf48</i>	Nome do primer	Sequência (5'→3')	Hibridação (°C)
C8orf48-MUTF		GCTCTTGCAAACCTTTCTGATGAG ATTGAGACTTTGAAGAAC	60
C8orf48-MUTR		GTTCTTCAAAGTCTCAATCTCATC AGAAAGGTTTGCAAGAGC	

Tabela V - Caracterização clínica dos indivíduos das famílias com FNMTC utilizadas para o estudo do gene *DICER1*.

N.º da família	Indivíduos da família	Sexo	Patologia da tiróide	Outras neoplasias
2	III.9 (P)	F	cPTC + MNG	SLCT
	III.4	F	cPTC	–
	IV.2	M	Gânglios na tiróide	–
	IV.4	M	cPTC	–
3	IV.2 (P)	F	cPTC+ NGocv	–
	IV.1	M	cPTC	–
	III.3	F	MNG	–
	III.1	F	MNG	–
	II.5	F	MNG	–
4	II.1 (P)	F	fvPTC	–
	II.4	F	cPTC	Tumor no ovário**
	I.1	F	MNG	–
	I.3	F	MNG	–
5	III.6 (P)	F	cPTC	–
	II.2	F	cPTC	–
	IV.10	F	cPTC + MNG	–
	III.8	F	microPTC	–
	III.12	F	MNG	–
	III.14	F	MNG	–
	IV.6	F	MNG	–
6	II.11 (P)	F	Microgânglios tiroideus	–
	II.8	M	cPTC	–
	II.7	F	FTA	Tumor no ovário**
	II.14	M	cPTC?	–
	II.12	M	FTA micro/macro folicular	–
7	III.1 (P)	F	cPTC+MNG	–
	II.1	F	MNG	–
	II.3	M	carcinoma da tiróide	–
	NR	F	carcinoma da tiróide?	–
	NR	F	MNG	–
8	III.1 (P)	M	microPTC+MNG	Cancro do cólon e recto
	III.16	F	MNG	–
	III.18	F	MNG	–
	III.20	F	fvPTC+MNG	–
	III.22	F	MNG	–
	IV.16	F	MNG	–

MNG, Bócio multinodular; NGocv, hiperplasia nodular com transformação oncocítica; FTA, Adenoma Folicular da Tiróide; PTC, Carcinoma Papilar da Tiróide; cPTC, PTC clássico; fvPTC, PTC variante folicular; SLCT, Tumor das células *Sertoli-Leydig* do ovário. P, probando; M, sexo masculino; F, sexo feminino; NR- não representado na árvore genealógica; ?, diagnóstico que aguarda confirmação; –, não apresenta outras neoplasias; ** - não existe informação sobre subtipo histológico

Tabela VI - Caracterização clínica dos indivíduos das famílias com FMNG utilizadas para o estudo do gene *DICER1*.

N.º da família	Indivíduos da família	Sexo	Patologia da tiróide	Outras neoplasias
9	III.2 (P)	F	Não apresenta doença tiroideia	Tumor Neuroectodérmico primitivo (PNET)
	I.2	F	MNG	—
	II.4	F	MNG	—
	II.20	M	MNG + quisto no canal tiroglosso	—
	III.6	F	MNG	—
	II.9	F	MNG?	—
10	II.8 (P)	F	MNG	—
	I.2	F	MNG	—
	II.2	F	MNG	—
	II.4	F	MNG	—
	II.6	F	MNG	—
	II.11	F	MNG	—
	III.2	F	MNG	—
11	III.2 (P)	F	MNG	—
	III.3	F	operada à tiróide	—
	III.5	F	MNG	—
	IV.2	F	MNG	—
	IV.10	F	Nódulo na tiróide + MNG	—
12	II.9 (P)	M	MNG	—
	II.8	F	MNG	—
	II.5	M	MNG	—
	II.2	F	MNG	—
	I.1	M	Não apresentava doença tiroideia	Cancro do pulmão

P, Probando; MNG, Bócio multinodular. M, sexo masculino; F, sexo feminino; NR, não representado na árvore genealógica; ?, diagnóstico que aguarda confirmação; —, não apresenta outras neoplasias.

Tabela VII - Caracterização clínica dos indivíduos das famílias com NMTC e MNG utilizadas para o estudo do gene *DICER1*.

N.º da família	Indivíduos da família	Sexo	Patologia da tiróide	Outras neoplasias
13	IV.3 (P)	F	PTC?	Cancro dos rins
	III.1	F	MNG	Cancro do fígado
	III.3	M	PTC?	–
	IV.10	F	Hipotiroidismo+ tiroidite linfocítica	–
	II.2	F	MNG?	Cancro da mama
	V.5	F	Hipotiroidismo	–
	II.4	F	MNG	–
14	III.1 (P)	F	MNG	–
	III.4	F	Não apresentava doença tiroideia	Cancro do ovário**
	III.3	M	Tumor na tiróide maligno	–
	III.2	F	MNG	Cancro da mama
	NR*	F	MNG	–
15	II.1 (P)	F	fvPTC + MNG	–
	II.2	F	MNG	–
	I.1	M	Não apresentava doença tiroideia	Cancro da próstata
	II.3	M	Não apresentava doença tiroideia	Cancro gástrico
	II.4	F	Não apresentava doença tiroideia	Cancro do cólon
	II.5	M	Não apresentava doença tiroideia	Cancro do fígado
	II.6	F	Não apresentava doença tiroideia	Cancro do pulmão
16	III.2 (P)	F	PTC variante esclerosante difusa	–
	II.4	F	MNG	Cancro dos rins
	II.5	M	MNG	–

P, Probando; MNG, Bócio multinodular; PTC, Carcinoma Papilar da Tiróide; cPTC, PTC clássico; fvPTC, PTC variante folicular. M, sexo masculino; F, sexo feminino; NR- não representado na árvore genealógica; ?, diagnóstico que aguarda confirmação; –, não apresenta outras neoplasias; *-prima em 2º grau do probando;**- não existe informação sobre subtipo histológico

Tabela VIII - Caracterização clínica da doente que apresentava MNG associado com tumor das células lípidas do ovário.

N.º Doente	Sexo	Patologia da tiróide	Outras patologias
17	F	FTA + MNG	Hiperplasia/adenoma da paratiróide; Tumor das células lípidicas do ovário produtor de testosterona

MNG, Bócio multinodular; FTA, Adenoma Folicular da Tiróide